

ANNALES

DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **M. PASTEUR**

PAR

E. DUCLAUX

COMITÉ DE RÉDACTION

D^r CALMETTE, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r L. MARTIN, sous-directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r ROUX, directeur de l'Institut Pasteur ;
D^r VAILLARD, membre de l'Académie de Médecine.

TOME QUARANTE-NEUVIÈME

Juillet-décembre 1932

AVEC DEUX PLANCHES

PARIS

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

120, Boulevard Saint-Germain (6^e).

QR

1

A475

v.49

July-Dec.

1932

PER

PARIS. — A. MARETHEUX ET L. PACTAT, IMP., 1, RUE CASSETTE. — 1932.

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

CAMILLE DELEZENNE

1868-1932

Les lecteurs de ces Annales, et tous ceux qui s'intéressent à la Physiologie, apprendront avec peine le décès, survenu presque subitement, le 6 juillet, de notre collègue, le D^r Delezenne, qui dirigeait le laboratoire de Physiologie de l'Institut Pasteur.

Au moment de la levée du corps, le D^r Roux a prononcé, au domicile du défunt, devant la famille et quelques amis, les paroles suivantes au nom de l'Institut Pasteur :

« Avec Camille Delezenne disparaît un des meilleurs d'entre nous, un de ceux qui ont le plus contribué au renom de l'Institut Pasteur. Il a introduit la rigueur des méthodes bactériologiques dans la Physiologie et l'a ainsi débarrassée de graves causes d'erreur.

« Le caractère de perfection qui distingue l'œuvre de Delezenne s'est manifesté dès ses premiers travaux; aussi, lorsqu'en 1930, étant professeur agrégé à la Faculté de Médecine de

Montpellier, il exprima le désir d'entrer à l'Institut Pasteur, y fut-il accueilli avec empressement. Du laboratoire de Physiologie, créé pour lui, et qu'il a dirigé pendant trente-deux ans, il est sorti des travaux qui ont promptement établi la renommée de Delezenne dans le monde savant. Ce n'est pas le moment d'exposer son œuvre en détail et de montrer les progrès qu'elle a apportés dans la Physiologie générale et dans diverses questions importantes qui avaient déjà préoccupé d'illustres physiologistes. Pour faire comprendre par un exemple la manière dont, partant d'un fait particulier, Delezenne agrandit le sujet jusqu'aux généralisations les plus inattendues, je dirai comment, répétant l'expérience bien connue de l'hémolyse des globules rouges par le venin des serpents en présence de traces de lécithine, il reconnaît que le venin agit comme un ferment, non sur les globules rouges, mais sur la lécithine qui est dédoublée en deux substances dont l'une, la lysocithine, est cristallisable. Il en établit la formule et la constitution avec le concours de son ami Fourneau. Cette lysocithine dissout les globules rouges à dose infime. Voici donc cette mystérieuse hémolyse réduite à l'action d'un produit chimique défini sur les globules sanguins. Ces mêmes venins agissent aussi sur l'acide nucléique et on comprend par quel mécanisme ils produisent *in vivo* l'hémolyse et la désintégration cellulaire. Puisque ces venins sont des ferments, ils doivent contenir un élément minéral servant de catalyseur dans les réactions qu'ils déterminent. Delezenne découvre en effet dans les venins la présence du zinc et celui-ci y est d'autant plus abondant que le venin est plus actif. Le zinc, présent dans les venins, provient des glandes qui le sécrètent. Soupçonnant que ce catalyseur joue un rôle dans le métabolisme cellulaire, Delezenne montre son existence dans toutes les cellules animales, où il est surtout abondant dans les éléments jeunes encore en développement. Le zinc est donc un constituant nécessaire des tissus animaux. Tel est le point auquel Delezenne arrive à la fin de son étude exposée dans un mémoire de moins de 100 pages, qui est un modèle par la précision et la clarté du style, de même que par l'importance de la découverte.

« C'est avec la même originalité et le même bonheur dans

la recherche qu'il avait traité de la coagulation du sang, des ferments digestifs à propos desquels il établit la notion féconde des couples fermentaires, et de bien d'autres sujets encore.

« Delezenne possédait l'esprit d'invention et l'esprit de finesse ; à ces éminentes qualités il joignait la modestie et l'aménité du caractère qui rendaient si agréable le travail sous sa direction. Rarement chef d'école inspira à ses disciples plus d'affection et plus d'attachement. Sa conversation était simple autant qu'instructive ; on était certain de trouver près de lui un conseil avisé lorsqu'on était empêtré dans un travail difficile.

« Désintéressé et sans grande ambition, Delezenne a vécu en sage dans son laboratoire. Son amitié était sûre, délicate et discrète. La famille Pasteurienne associe sa douleur à celle de M^{me} Delezenne et de ses enfants et c'est en commun que nous déplorons la perte prématurée d'un savant d'un si rare mérite et d'une si parfaite bonté. »

SUR LA SENSIBILITÉ A LA TUBERCULINE DES ENFANTS VACCINÉS AU BCG PAR VOIE BUCCALE

par ROBERT DEBRÉ, MARCEL LELONG et M^{lle} PICTET.

L'étude qui va suivre est la suite de nos travaux de 1928 et 1929 sur la sensibilité à la tuberculine des enfants vaccinés contre la tuberculose suivant la méthode de M. Calmette. Nous nous abstenons de tout exposé historique; la presque totalité des publications se rapportent à des enfants vaccinés, mais non séparés du milieu tuberculeux, ou, si la séparation a eu lieu, elle l'a été pendant un temps très court. Dans les cas les plus favorables d'enfants nés de parents sains, et vivant dans un milieu apparemment indemne de tuberculose, on ne peut écarter l'éventualité d'une contamination occulte. Dès lors, la constatation d'une réaction positive à la tuberculine sera délicate à interpréter, puisque la certitude manque pour affirmer que seule la vaccination par le BCG est intervenue pour provoquer son apparition.

Nous avons eu la chance, très exceptionnelle, de poursuivre nos études dans les conditions idéales que nous rappellerons brièvement. Elles sont capitales et donnent toute leur valeur aux résultats que nous exposerons plus loin. Tous les enfants dont nous parlerons sont nés de parents tuberculeux. Ils sont divisés en deux groupes, dont l'un, le plus important, provient de la prophylaxie anténatale, et n'a subi aucun contact tuberculeux. Il s'agit d'enfants séparés à la naissance, grâce à l'organisation réalisée par le professeur Couvelaire, la collaboration du professeur Léon Bernard, et la nôtre à la clinique Baudelocque. Les enfants sont éloignés de la mère à l'accouchement et ne reçoivent pas de visites. La vaccination des enfants est pratiquée à la clinique même, dans les dix premiers jours de la vie. De cette façon, nous avons la certitude que les enfants ont bien ingéré les trois doses de vaccin dans les délais convenables. Leur séjour à la clinique est de durée variable, en

moyenne de trois à sept semaines, et, dès qu'ils peuvent supporter le voyage, ces enfants sont conduits à la campagne où ils sont élevés par les soins de l'Œuvre de Placement Familial des Tout-Petits. Cette Œuvre possède ses centres d'élevage en Sologne; les enfants sont placés dans des familles, soigneusement choisies, où ils restent sous la surveillance du médecin et des infirmières du centre. Les visites des parents dans les centres sont soumises à un contrôle sévère. Douze années d'expériences ont prouvé que les enfants ne deviennent pas tuberculeux durant leur séjour dans les centres de l'Œuvre de Placement Familial des Tout-Petits.

Nous avons dit plus haut que les enfants qui ont été l'objet de notre étude se répartissaient en deux groupes : le premier est composé d'enfants n'ayant jamais subi le moindre contact tuberculeux grâce à la prophylaxie anténatale; ce sont des enfants « séparés ». Presque tous ont été vaccinés à la naissance par le vaccin de M. Calmette. Nous appellerons ces enfants dans la suite : *enfants BCG sans contact*.

D'autres enfants séparés n'ont pas été vaccinés. Nous les appellerons *enfants témoins sans contact*.

Le deuxième groupe comprend des enfants ayant subi un contact tuberculeux plus ou moins long et intime. Ce groupe comprend, comme le précédent, des enfants vaccinés et des non vaccinés. Pour simplifier, nous appellerons les enfants vaccinés *enfants BCG avec contact*, et les non-vaccinés *enfants témoins avec contact*.

Avant d'être admis à l'Œuvre du Placement Familial des Tout-Petits, les enfants de ce deuxième groupe, qui ont subi un contact tuberculeux, sont hospitalisés dans des crèches qui leur sont destinées. Le but de cette période d'observation est de dépister les enfants susceptibles de présenter une évolution tuberculeuse et qui, de ce fait, n'étant plus justiciables d'un placement familial doivent être dirigés sur un préventorium. L'Œuvre du Placement Familial des Tout-Petits accepte des enfants non vaccinés ayant subi un contact tuberculeux actif, puisque leur cuti-réaction est positive; mais elle n'admet ces enfants, dits *enfants contaminés*, qu'à condition que leur état général soit excellent, et cela après une période d'observation d'au moins six semaines.

*
* *

Lorsque, avec Cofiño, en 1928 et 1929, nous avons commencé nos observations (1), nous voulions nous rendre compte de quelle façon et dans quelles proportions les enfants vaccinés, selon la méthode de M. Calmette, réagissaient à la tuberculine.

Nos observations d'alors n'ont porté que sur des enfants séparés, enfants témoins sans contact, et enfants BCG sans contact. Ils ont tous été soumis à une réaction de Pirquet. Quand cette réaction est restée négative, nous avons fait une intradermo-réaction de Mantoux à la dose de $1/10^e$ de milligramme de tuberculine pour $1/10^e$ de centimètre cube de solution. Trois mois plus tard, nous avons refait une intradermo-réaction à la même dose aux enfants ayant réagi positivement, pour voir si leur sensibilité était restée la même; et à une dose plus élevée, de $1/2$ milligramme de tuberculine pour $1/10^e$ de centimètre cube de solution, à ceux qui étaient restés négatifs la première fois. Après quelque temps, nous avons continué de la même manière en employant des doses de 1 milligramme pour $1/10^e$ de centimètre cube de solution.

Nous avons pu constater que *toutes les réactions faites aux enfants témoins sans contact étaient restées négatives*. C'est dire que les enfants du Placement Familial des Tout-Petits vivent dans un milieu indemne de tuberculose; ils n'y subissent ni contamination humaine, ni contamination bovine. Cette preuve bien établie, nous ne pouvions attribuer qu'à l'action du BCG les réactions positives trouvées chez les enfants qui ont ingéré le vaccin. Or, sur 132 enfants BCG sans contact, dont la sensibilité à la tuberculine a été éprouvée, nous avons trouvé : cuti-réactions positives, 42; intradermo-réactions positives à $1/10^e$ de milligramme, 55; intradermo-réactions positives à $1/2$ milligramme, 17; intradermo-réactions positives à 1 milligramme, 3. 15 enfants sur 132 n'ont pas réagi à la dose de 1 milligramme. Soit 11,4 p. 100 d'enfants ne réagissant pas à l'épreuve de la tuberculine à raison de 1 milligramme par intradermo-réaction.

(1) Ces *Annales*, 45, 1930, p. 12.



Nous avons pensé, en poursuivant cette étude, qu'il serait intéressant de voir d'une part si le pourcentage des enfants négatifs ne diminuerait pas en augmentant la dose de tuberculine injectée et, d'autre part, d'établir pour chaque enfant le degré de sa sensibilité à la tuberculine à un moment donné. Pour cela, il a fallu faire des injections en série. Nous avons cherché à perfectionner notre méthode de travail par la précision de nos dosages de tuberculine, précision indispensable, puisque nous procédons par séries d'injections à doses croissantes.

Nous commençons toujours par la cuti-réaction de Pirquet. Avec un vaccinostyle, nous faisons deux scarifications à 5 centimètres l'une de l'autre; l'inférieure reçoit une goutte de tuberculine brute de l'Institut Pasteur, la supérieure servant de témoin. Jusqu'ici, nous n'avons jamais recouvert nos scarifications de toile gommée. Il est certain que, par ce procédé, nous aurions obtenu un pourcentage plus élevé de cuti-réactions positives.

Nos intradermo-réactions sont faites à doses croissantes. La quantité injectée est toujours la même, de $1/10^e$ de centimètre cube. La concentration seule variera de $1/10^e$ de milligramme à 1 centigramme de tuberculine, en passant par $1/2$ milligramme, 1 milligramme, 1 milligramme $1/2$, 2 milligrammes, 5 milligrammes, 7 milligrammes.

Pour obtenir des solutions régulièrement titrées, nous procédons comme suit : nous disposons de petits tubes stérilisés, bouchés par une capsule de caoutchouc. Leur contenance est d'environ 8 cent. cubes. La tare de chaque tube étant faite, on y introduit la quantité désirée de tuberculine, contrôlée par pesage et marquée sur le tube. Nous faisons nos solutions nous-mêmes, le jour de l'emploi, à l'aide de sérum physiologique stérile. Nous avons des pipettes finement graduées dont l'une ne contient que 1 cent. cube, divisé en dixièmes de centimètre cube. Un calcul élémentaire permet de faire un dosage précis. Exemple : pour faire une solution contenant $1/10$ de milligramme de tuberculine pour $1/10$ de centimètre

cube de solution, nous prendrons un tube contenant aux environs de 6 milligrammes de tuberculine; il en contiendra peut-être 6 milligr. 4. Nous ajouterons 6 cent. cubes + $4/10$ de centimètre cube de sérum physiologique. Et ainsi de suite.

L'exécution de notre travail offre certaines difficultés. Nous sommes obligés d'aller à domicile pour faire nos réactions. Il faut procéder avec rapidité et sûreté. Une bonne instrumentation est donc nécessaire. Nous avons fait fabriquer une seringue selon nos indications (1). On la remplit comme toutes les seringues; après quoi, un dispositif très simple permet d'immobiliser le piston. La tige de ce dernier est cannelée en spirale; une fois immobilisé, le piston ne peut avancer qu'en tournant dans un pas de vis. Chaque tour complet provoque l'injection d'une dose exacte de $4/10$ de centimètre cube. L'embout de la seringue est muni d'une ailette qui s'applique sur le bras de l'enfant. On peut ainsi fixer d'une main et le bras et la seringue, l'autre main restant libre pour manœuvrer le piston. L'introduction intradermique du liquide, surtout chez les tout-petits, est parfois difficile à réaliser. La résistance des tissus cutanés peut être considérable; elle sera vaincue plus facilement par le mouvement de rotation du piston que lorsqu'on le pousse, comme c'est le cas avec les seringues habituelles. La main qui immobilise le bras et la seringue permet de faire contrepoids à ce mouvement de rotation. Nos aiguilles sont en platine iridié, très courtes et fines, à biseau court.

Nous commençons toujours par pratiquer une cuti-réaction; nous la lisons après quarante-huit ou soixante-douze heures. Si elle est négative ou douteuse nous faisons, de suite, une intradermo-réaction au $4/10$ de milligramme qui sera vérifiée après quarante-huit ou soixante-douze heures. Nous procédons de même jusqu'à concurrence de 1 centigramme de tuberculine.

Nous n'avons jamais observé le moindre inconvénient en procédant avec cette prudence. Au début, nous avons eu quelques hostilités à vaincre et certains malaises des enfants devaient

(1) Exécutée par la Maison Gentile.

infailliblement être attribués aux injections. Grâce au dévouement des infirmières qui ont bien voulu observer systématiquement les enfants, nous avons pu aisément convaincre chacun que jamais un accès de fièvre, ni une perte de poids ne pouvaient être imputés aux intradermo-réactions, quelle que fût la dose de tuberculine injectée. Nous avons comparé nous-mêmes les courbes de poids correspondant aux différentes périodes (avec et sans injection de tuberculine) : elles n'accusent aucune différence.

LECTURE DES INTRADERMO-RÉACTIONS.

En étudiant, comme nous venons de le dire, la sensibilité à la tuberculine, c'est-à-dire en débutant toujours par une cuti-réaction qui ne sera suivie d'une intradermo-réaction à 1/10 de milligramme que si elle est négative ou douteuse, nous évitons la production de réactions violentes. Nous n'avons jamais de réactions phlycténulaires. Les enfants vaccinés au BCG sans contact peuvent avoir une sensibilité tuberculinique très forte; en ce cas, ils réagissent toujours à la cuti-réaction. Un avantage des intradermo-réactions en série est de revoir les enfants : c'est là le seul moyen de diagnostic pour reconnaître vraiment les réactions traumatiques. Elles sont difficiles à différencier des réactions vraies à première vue, car souvent un œdème dur simule l'induration de la réaction franche. En général, la couleur est plus vive, moins violacée dans la réaction traumatique; mais surtout, — nous avons déjà insisté sur ce point avec Cofiño, — la réaction traumatique disparaît toujours sans laisser de trace en deux à trois jours, alors que la réaction vraie, même faible, laisse toujours une pigmentation très visible ainsi qu'une induration. Nous avons vu certaines pigmentations persister de six à huit semaines.

Nous avons adopté la classification suivante : cuti-réaction + ; intradermo-réaction 1/10 de milligramme + ; intradermo-réaction 1/2 milligramme + ; intradermo-réaction 1-2 milligrammes + ; intradermo-réaction 2-5 milligrammes + ; intradermo-réaction 5 milligrammes-1 centigramme +. Cette

notation signifie que l'enfant marqué : I. D. 1/10 de milligramme +, ou I. D. 1/2 milligramme + avait, avec les épreuves antérieures à doses plus faibles, des réactions franchement négatives. A la vérité, ceci n'est plus tout à fait exact lorsqu'il faut employer des doses élevées de tuberculine pour mettre la sensibilité en évidence. Les enfants marqués I. D. 1-2 milligrammes + ont en général une première réaction à 1 milligramme de tuberculine que l'on pourrait marquer très faiblement positive, les deux autres réactions à 1 milligr. 1, 2 et 2 milligrammes étant positives. Il en est de même pour les réactions de 2-5 milligrammes et de 5 milligrammes à 1 centigramme.

Toutes les réactions franchement positives se ressemblent. Seul leur diamètre et l'induration diminuent un peu au fur et à mesure que l'on doit augmenter la dose de tuberculine pour les provoquer.

Nous avons considéré certaines de nos réactions obtenues avec 1 centigramme comme méritant le qualificatif : plus-moins (\pm), et d'autres l'indication : douteux. Il s'agit d'enfants ayant eu toute la gamme des intradermo-réactions restées franchement négatives jusqu'à 2 ou 5 milligrammes de tuberculine. A partir de ce moment, non seulement la trace des piqûres ne disparaît pas d'une fois à l'autre, mais on voit les intradermo-réactions antérieurement marquées négatives se dessiner, se pigmenter secondairement. En passant le doigt, on sent un granité plus ou moins accusé. Lorsque la pigmentation, le granité sont très nets, nous marquons : I. D. 1 centigramme \pm . Si la pigmentation est moins nette ainsi que le granité, si on ne les voit ou sent qu'à partir des doses de 5 milligrammes, nous avons marqué : I. D. 1 centigramme douteux.

Nous n'avons vu ces réactions que chez les enfants vaccinés au BCG et quelquefois chez des enfants témoins avec contact. Jamais un vrai témoin, c'est-à-dire un enfant *sans contact*, n'a eu ces réactions; jamais une réaction traumatique n'a laissé de traces semblables.

Nous reparlerons de ces réactions dans la suite.

Disons enfin que toutes les fois que nous marquerons une réaction par : I. D. 1 centigramme, cela voudra dire que

l'enfant a subi une cuti-réaction négative, plus 8 intra-dermo-réactions allant de 1 10 de milligramme à 1 centigramme de tuberculine par injection intradermique, toutes négatives.

. . .

Nos observations actuelles ont été faites du mois de décembre 1929 au mois de décembre 1931. Cependant nous n'avons pris en considération que celles comprises entre le mois de mai 1930 et le mois de décembre 1931. L'époque qui s'est écoulée entre les mois de décembre 1929 et de mai 1930 ayant été consacrée à la préparation et la mise au point de notre travail, nous n'avons pas voulu en tenir compte. Il est, en effet, facile de comprendre qu'il faut un outillage bien spécial pour faire ces réactions à domicile et à la campagne, et que la manière de procéder n'a rien de commun avec le travail à l'hôpital. Il y a, de plus, une question d'adaptation réciproque, d'éducation des nourriciers et même des enfants, qui ne s'acquiert pas en un jour.

Notre étude, du mois de mai 1930 au mois de décembre 1931, a porté sur 639 enfants nous donnant un total de 1.346 observations.

Résultats des épreuves à la tuberculine chez les enfants témoins sans contact.

Nous avons suivi, de mai 1930, à décembre 1931, 80 enfants *témoins sans contact* qui nous donnent un total de 182 observations.

Enfants ayant subi à trois reprises les épreuves à la tuberculine.	43
Enfants ayant subi à deux reprises les épreuves à la tuberculine.	46
Enfants ayant subi une seule fois les épreuves à la tuberculine.	21
	<hr/> 80

Lorsque nous avons soumis, pour la première fois, ces enfants à l'épreuve de la tuberculine, nous n'avons patiqué que des cuti-réactions, qui ont toutes été négatives. 35 de

ces enfants avaient été soumis aux épreuves tuberculiniques à trois reprises en 1928 et 1929. Ils étaient tous restés franchement négatifs à la dose d'un milligramme par intradermo-réaction.

L'ensemble de nos épreuves faites à ces 80 enfants témoins nous a donné : 73 cuti-réactions négatives et 109 I. D. 1 centigramme négatives.

Nous constatons donc qu'*aucun enfant-témoin sans contact n'a été sensible à la tuberculine*, même à la dose de 1 centigramme. Nous insistons sur un fait, c'est que, d'une intradermo-réaction à la suivante, — il y en a 8 en tout, — les traces de piqûre s'effacent et ne sont plus visibles. En faisant la dernière, il est impossible de dire où ont été faites les premières.

La majorité des enfants, depuis quelques années, reçoivent le vaccin BCG à la naissance ; de ce fait, nous avons de moins en moins d'enfants témoins sans contact. Les 80 enfants dont il s'agit sont presque tous de grands enfants, âgés de deux ans et demi à cinq ans. Notre statistique n'en a que plus de valeur.

Tous les enfants du Placement familial des Tout-Petits vivent dans les mêmes conditions d'hygiène. Les nourriciers ont en garde, en même temps, des enfants non vaccinés, des enfants vaccinés, des enfants sans contact provenant de la prophylaxie anténatale et des enfants ayant eu des contacts bacillaires. Si la contamination tuberculeuse n'existe pas pour les enfants témoins sans contact — et nous en avons la preuve par ce qui précède — elle n'existera pas davantage pour les autres enfants. Les réactions positives à la tuberculine que nous trouverons chez les enfants BCG sans contact ne pourront, par conséquent, être attribuées qu'à l'action du vaccin ingéré.

Résultats des épreuves à la tuberculine chez les enfants témoins avec contact.

Si les enfants témoins sans contact, provenant de la prophylaxie anténatale, sont au Placement familial des Tout-Petits pour ainsi dire depuis leur naissance, il n'en est plus de même

pour les enfants témoins avec contact. Ces derniers ont vécu un temps plus ou moins long au contact du parent malade. Il s'agit, presque toujours, d'un père malade, et le contact a été léger. En effet, si l'enfant a subi un contact long, intime ou massif, il est, en général, contaminé au moment où nous l'admettons, c'est-à-dire que sa cuti-réaction sera positive à l'admission ou le deviendra peu après, si la période anté-allergique a été un peu longue. Ces enfants ne sont plus comptés parmi les enfants témoins avec contact. Ils font partie du groupe dit : *Enfants contaminés*. La plupart des enfants ayant vécu au contact d'un tuberculeux sont âgés de douze à vingt-quatre mois à leur admission ; quelques-uns ont de vingt-quatre à trente mois.

Nous avons suivi, du mois de mai 1930 au mois de décembre 1931, 134 enfants témoins avec contact qui nous donnent un total de 268 observations.

Enfants ayant subi à trois reprises les épreuves à la tuberculine	54
Enfants ayant subi à deux reprises les épreuves à la tuberculine	26
Enfants ayant subi une seule fois l'épreuve à la tuberculine	54
	<hr/> 134

L'ensemble de nos épreuves nous a donné : 102 cuti-réactions négatives ; 130 intradermo-réactions négatives à 1 centigramme ; 33 intradermo-réactions douteuses à 1 centigramme ; 3 intradermo-réactions faiblement positives de 5 milligrammes à 1 centigramme.

Les réactions négatives à 1 centigramme sont franchement négatives, c'est-à-dire que les intradermo-réactions antérieures ont disparu d'une réaction à la suivante, sans laisser de traces. 113 de nos 134 enfants ont réagi négativement à toutes les épreuves.

21 enfants témoins avec contact ont réagi par des réactions douteuses à la dose de 1 centigramme de tuberculine par intradermo-réaction. 3 de ces 21 enfants ont eu une intradermo-réaction faiblement positive de 5 milligrammes à 1 centigramme, après avoir eu des réactions douteuses à 1 centigramme quelque temps auparavant.

Voici les 3 enfants dont il s'agit :

1. Bou. M. à 20 mois I. D. 1 cg. douteux; à 24 mois I. D. 5 mg.-1 gr. fbt. +
2. Dem. M. à 24 mois I. D. 1 cg. douteux; à 32 mois I. D. 5 mg.-1 gr. fbt. +
3. Gué. G. à 34 mois I. D. 1 cg. douteux; à 37 mois O. D. 5 mg.-1 gr. fbt. +

Ces 21 enfants à réactions douteuses ou faiblement positives de 5 milligrammes-1 centigramme se portent bien. L'avenir nous montrera si leur sensibilité à la tuberculine ira en augmentant ou s'ils se comporteront comme certains enfants vaccinés au BCG, dont la sensibilité ne se manifestera jamais que pour les doses élevées de tuberculine.

Ces 21 enfants mis à part, nous voyons que 113 enfants témoins avec contact restent franchement négatifs aux intradermo-réactions de 1 centigramme. Nous avons le droit d'affirmer que, pas plus que les enfants témoins sans contact, ils n'ont été soumis à un nouveau contact tuberculeux pendant leur séjour au Placement familial des Tout-Petits.

Leur nombre de 113 peut s'ajouter à celui de nos 80 enfants témoins sans contact, ce qui nous donne un nombre imposant de 193 enfants témoins, non vaccinés au BCG, qui, restant absolument négatifs à toutes les épreuves à la tuberculine, nous fournissent une preuve irréfutable du milieu sain, exempt de tuberculose, où ils vivent.

La présence de ces enfants témoins, négatifs à toutes les épreuves de tuberculine, nous est infiniment précieuse. Elle est d'une telle valeur qu'il nous est permis d'affirmer, sans aucune présomption, que toutes les réactions positives que nous allons constater chez les enfants BCG sans contact ne peuvent se rapporter qu'à l'action du vaccin BCG ingéré à la naissance et que toute contamination bacillaire même d'origine bovine est exclue.

Résultats des épreuves à la tuberculine chez les enfants vaccinés au BCG « sans contact ».

Du mois de mai 1930 au mois de décembre 1931, nous avons fait subir les épreuves tuberculiniques à 297 enfants BCG sans contact, nous donnant un total de 619 observations.

Il se trouve que 83 de ces enfants ont subi des épreuves à la tuberculine pendant la période 1928-1929. 42 étaient alors âgés de moins d'un an. Il nous a semblé utile de multiplier au maximum les observations et, dans la suite, nous parlerons de ces 297 enfants en comprenant toujours les observations, au nombre de 214, auxquelles ont donné lieu 83 de ces mêmes enfants de 1928-1929. Nous disposons ainsi d'un total de 297 enfants vaccinés au BCG sans contact, donnant 833 observations.

L'analyse des épreuves subies par ces enfants n'est pas aussi simple à faire que celles qui concernent les enfants témoins, sans et avec contact. Il faut envisager, tout d'abord, le mode de réaction de chaque enfant à la tuberculine. Chaque enfant, en effet, a sa manière de réagir et il la conserve, pour autant que nous avons pu l'observer.

Le tableau I nous présente ces 297 enfants répartis en 7 groupes, suivant le nombre de fois qu'ils ont été soumis aux séries d'épreuves de tuberculine. Chaque enfant est inscrit dans la colonne qui correspond à son mode de réaction. Nous en avons établi 4, qui traduisent une sensibilité à la tuberculine *nette, faible, ébauchée et négative*. Expliquons-nous.

La *sensibilité nette* est caractérisée par des réactions positives allant d'une cuti-réaction positive à une intradermo-réaction positive à 2 milligrammes de tuberculine.

Nous rappellerons à ce propos que l'enfant, que nous marquons : I. D. (Intradermo) 2 milligrammes +, a déjà eu, lors de cette série d'épreuves, des réactions très faiblement ou faiblement positives à partir de 1 milligramme de tuberculine par intradermo-réaction ; sinon, il sera marqué : I. D. 2 à 5 milligrammes +.

La *sensibilité faible* est celle qui est révélée par des réactions positives à la tuberculine, allant d'une intradermo-réaction positive de 2 milligrammes à une intradermo-réaction positive de 1 centigramme.

La *sensibilité ébauchée* donne des intradermo-réactions de 1 centigramme qui seront « plus-moins » (\pm) ou douteuses.

La *sensibilité négative* est celle qui correspond à des réactions négatives jusqu'à 1 centigramme par inoculation intradermique.

Nous disions plus haut qu'un enfant ne changeait pas de sensibilité dans les périodes où nous avons pu l'observer. C'est vrai pour l'enfant dont l'allergie est bien établie; nous verrons plus loin qu'il en est surtout ainsi à partir de deux ans. Mais certains enfants, très jeunes, en dessous de six mois, surtout en dessous de trois mois, peuvent avoir une sensibilité ébauchée ou faible, mais qui se révélera, à l'épreuve suivante, la sensibilité définitive de l'enfant, définitive pour nous, dans les limites de notre temps d'observation, c'est-à-dire jusque vers cinq ans.

Cette *fixité* dans le mode de réaction est une règle pratiquement absolue; quelques enfants seuls y font exception (guère plus de quatre en tout), qui ont présenté, tantôt une sensibilité nette, tantôt une sensibilité ébauchée, faible ou négative. Ils ont présenté ce caractère de variabilité dans leur sensibilité pendant plusieurs années. Pour curieux que soit leur cas, il est si rare que nous nous contenterons de le mentionner ici.

Divers auteurs et nous-mêmes avons parlé des variations dans la sensibilité des réactions, c'est-à-dire d'enfants vaccinés ayant tantôt une réaction positive, tantôt une réaction négative. Mais, en réalité, de quels faits s'agit-il? Les enfants vaccinés ont en général une sensibilité à la tuberculine moins forte que les enfants contaminés naturellement, d'où ces apparences de variations pour ceux qui ont une sensibilité faible « à la limite » et qu'on interprétera tantôt comme positifs, tantôt comme négatifs. Lorsque nous parlons d'oscillations dans la sensibilité, nous entendons ici, simplement, que l'enfant présente des variations dans les limites de sa sensibilité, nette, faible ou ébauchée. L'enfant habituellement sensible à une intradermo-réaction au 1/10 de milligramme pourra, par moments, présenter une intradermo-réaction positive au 1/2 milligramme et négative au 1/10 de milligramme, tout comme il pourrait avoir une cuti-réaction positive. Celle-ci ne sera jamais ++; cette variation est spéciale aux enfants à cuti-réaction habituellement positive, enfants de sensibilité particulièrement nette. Le fait essentiel est que le même enfant n'aura jamais de ces réactions qui caractérisent les autres sensibilités. Voilà ce que nous entendons par *fixité* de la sensi-

bilité (1). Quelques enfants sont plus sujets que d'autres à ces variations; leurs oscillations sont plus grandes. Par exemple : de cuti-réaction positive à une intradermo-réaction positive de 4 milligramme. Ils restent cependant toujours dans les limites que nous avons indiquées pour la sensibilité. Ces enfants représentent peut-être une transition entre ceux qui répondent à la règle de fixité, qui sont la grande majorité, et les quelques enfants mentionnés plus haut qui y font exception.

Avant d'entrer dans le vif de la discussion des chiffres

			Nombre d'enfants	Nombre d' Observations	Sensibilité <u>nette</u>	Sensibilité <u>faible</u>	Sensibilité <u>négative</u>	Sensibilité <u>ébauchée</u>
Enfants ayant subi	1 fois	l'épreuve à la tuberculine	66	66	33	6	4	23
Enfants ayant subi	2 fois	l'épreuve à la tuberculine	78	156	39	15	1	23
Enfants ayant subi	3 fois	l'épreuve à la tuberculine	80	240	49	18	1	12
Enfants ayant subi	4 fois	l'épreuve à la tuberculine	29	116	19	1	4	5
Enfants ayant subi	5 fois	l'épreuve à la tuberculine	17	85	16	1	.	.
Enfants ayant subi	6 fois	l'épreuve à la tuberculine	19	114	18	.	.	1
Enfants ayant subi	7 fois	l'épreuve à la tuberculine	8	56	6	1	.	1
Total			297	833	180	42	10	65
			Pourcent.		60.61%	14.15%	3.36%	21.88%

TABLEAU I. — Répartition en sensibilités nette, faible, négative et classement d'après le nombre des séries d'épreuves tuberculiques subies par l'enfant. Ce tableau concerne 297 enfants vaccinés, sans contact, représentant 833 séries complètes d'épreuves tuberculiques.

obtenus pour chaque catégorie, que le lecteur nous permette d'expliquer les tableaux et les graphiques qui leur correspondent.

(1) Nous avons l'air de nous contredire lorsque nous parlons de certains enfants dont quelques observations sont marquées par nous I. D. 1 cg. —, alors qu'en général leurs réactions étaient I. D. 1 cg. \pm (ou douteuses). Ce n'est là qu'une apparence. Nos réactions ne vont pas au delà de 1 centigramme, et nous ignorons comment ces enfants auraient réagi à une dose plus élevée de tuberculine. Ne trouvant pas leurs réactions à 1 centigramme suffisamment précises pour les dénommer \pm , ou douteuses, nous avons dit : I. D. 1 cg. —. Ceci pour ne pas créer une rubrique de plus. Mais nous affirmons que ces réactions n'ont pas le caractère d'absolue négativité que présentent celles des enfants témoins, ou celles des enfants *négalifs stables*.

		Réactions Nettes				faibles				négatives				ébauchées	
Âges des enfants	Nombre	Cuti-Réact. + Nbre %	I.D.Réact. 1/10 mmg + Nbre %	I.D.Réact. 1/2 mmg + Nbre %	I.D.Réact. 1-2 mmg + Nbre %	I.D.Réact. 2-5 mmg + Nbre %	I.D.Réact. 5 mmg, 1cg + Nbre %	Cuti-Réact. et I.D.Réact. 1/10 mmg + Nbre %	I.D.Réact. 2 mmg + Nbre %	I.D.Réact. 4 mmg + Nbre %	I.D.Réact. 1 cg + Nbre %	I.D.Réact. 1 cg + Nbre %	I.D.Réact. 1 cg + Nbre %		
0-3 mois	40	4 10	2 5	3 7.50	3 7.50	2 5	3 7.50	2 5	1 2.50	2 5	1 2.50	6 15	11 27.50		
3-6 mois	85	9 10.59	19 22.36	6 7.06	7 8.24	1 1.18	10 11.77	7 8.24	1 1.17	2 2.35	9 10.58	14 16.46			
6-9 mois	49	4 8.15	6 12.25	2 4.09	9 18.37	3 6.12	5 10.21	4 8.16	4 8.16	7 14.29	2 4.08	3 6.12			
9-12 mois	28	4 14.28	10 35.71	1 3.57	3 10.71	1 3.57	1 3.57	1 3.57	1 3.57	1 3.57	2 7.17	6 21.42			
12-15 mois	34	6 10.65	10 29.40	3 8.83	3 8.83	3 8.83	2 5.88	3 8.82	4 11.76	1 2.94	1 2.94	1 2.94			
15-18 mois	21	6 28.58	6 28.58	2 9.52	1 4.76	1 4.76	1 4.76	1 4.76	1 4.76	2 9.52	1 4.76	1 4.76			
18-21 mois	10	3 30	3 30	1 10	1 10	1 10	2 20	2 20	1 10	1 10	1 10	1 10			
21-24 mois	16	7 43.75	6 37.50	1 6.25	1 6.25	1 6.25	2 12.50	2 12.50	1 6.25	1 6.25	1 6.25	1 6.25			
2-2 1/2 ans	6	1 16.67	3 50	1 16.67	1 16.67	1 16.67	3 50	3 50	1 16.67	1 16.67	1 16.67	1 16.67			
2 1/2-3 ans	2	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50			
3-3 1/2 ans	4	3 75	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25	1 25			
3 1/2-4 ans	0														
4-5 ans	2	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50	1 50			
Total	297	46 15.46	66 22.23	17 5.73	30 10.11	10 3.37	21 7.08	25 8.42	7 2.36	17 5.73	3 1.01	20 6.72	35 11.78		
		53.53 %				18.87 %				9.10 %				18.50 %	

TABLEAU II. — Nombre des réactions et pourcentages correspondants. Ce tableau concerne 297 enfants vaccinés au BCG sans contact. La réaction est notée à l'âge où la sensibilité de l'enfant à la tuberculine a été éprouvée pour la première fois.

LA TUBERCULINE CHEZ LES ENFANTS VACCINÉS AU BCG 19

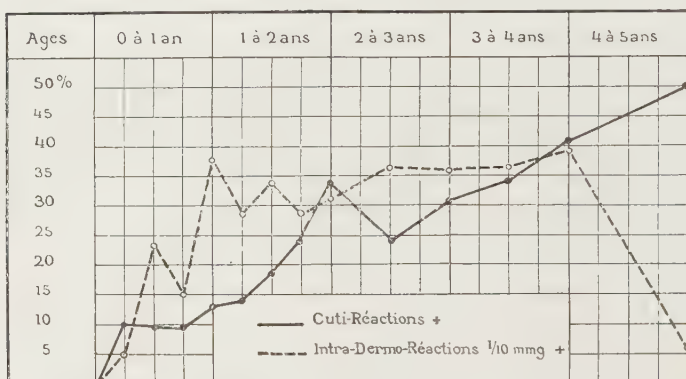
		Réactions Nettes				faibles				négatives				ébauchées	
Âges	Nombre des enfants	Cuti-Réact. + Nbre et %	I.D. Réact. 1/10 mmg + Nbre et %	I.D. Réact. 1/2 mmg + Nbre et %	I.D. Réact. 1-2 mmg + Nbre et %	I.D. Réact. 2-5 mmg + Nbre et %	I.D. Réact. 5mmg-1cg + Nbre et %	Cuti-Réact. et I.D. Réact. 1/10mmg + Nbre et %	I.D. Réact. 2 mmg + Nbre et %	I.D. Réact. 4 mmg + Nbre et %	I.D. Réact. 1cg + Nbre et %	I.D. Réact. 1cg + Nbre et %	I.D. Réact. 1cg doux + Nbre et %		
0-3 mois	40	4 10	2 5	3 7.5	3 7.5	2 5	3 7.5	2 5	1 2.5	2 5	1 2.5	6 15	11 27.5		
3-6 mois	91	9 9.90	21 23.08	6 6.60	10 10.99	1 1.10	11 12.09	7 7.69	1 1.09	2 2.19	9 9.89	14 15.38			
6-9 mois	95	9 9.48	15 15.79	4 4.22	11 11.58	11 11.58	8 8.42	5 5.26	4 4.22	7 7.36	2 2.10	7 7.36	12 12.63		
9-12 mois	75	9 12	28 37.34	5 6.66	10 13.34	5 6.66	4 5.34	4 5.34	1 1.34	5 6.66	8 10.66				
12-15 mois	82	11 13.42	23 28.05	10 12.20	4 4.88	3 3.66	5 6.09	5 6.10	4 4.88	5 6.09	5 6.09	7 8.54			
15-18 mois	64	12 18.76	22 34.38	5 7.82	1 1.57	2 3.12	7 10.93	3 4.68	1 1.57	2 3.12	2 3.12	3 4.68	4 6.25		
18-21 mois	61	15 24.60	17 27.87	6 9.84	5 8.20	3 4.92	2 3.28	4 6.56	3 4.91	3 4.91	3 4.91				
21-24 mois	69	23 33.34	22 31.89	8 11.60	3 4.35	2 2.90	3 4.34	2 2.90	3 4.34		3 4.34	3 4.34			
2-2 1/2 ans	82	19 23.18	30 36.59	6 7.32	5 6.10	1 1.22	4 4.87	9 10.97	5 6.10	3 3.65					
2 1/2-3 ans	61	19 31.16	22 36.07	7 11.48	4 6.56	2 3.28	4 6.56	1 1.63	1 1.63	1 1.63					
3-3 1/2 ans	47	16 34.05	17 36.18	5 10.64	3 6.39	2 4.25	2 4.25	1 2.12	1 2.12						
3 1/2-4 ans	36	15 41.67	14 38.89	1 2.78	1 2.78	1 2.78	2 5.55	2 5.55							
4-5 ans	30	15 50	2 6.67	2 6.67	1 3.34	1 3.33	1 3.33	1 3.33	1 3.33	1 3.33	3 10	3 10			
Total	833	176 21.14	235 28.21	68 8.17	60 7.20	26 3.12	54 6.48	45 5.40	10 1.20	21 2.52	18 2.16	49 5.88	71 8.52		
		64.72 %				15 %				5.88 %				14.40 %	

TABLEAU III. — Résultats par âge et par nombre d'observations (833) des tuberculino-réactions pratiquées sur 297 enfants vaccinés au BCG, sans contact.

Nous avons dit que le *tableau I* présente les 297 enfants, répartis d'après la sensibilité qu'ils ont acquise; nous avons expliqué ce que nous entendons par ces *sensibilités nette, faible, ébauchée et négative*.

La *tableau II* montre à quel âge chaque enfant a décelé sa sensibilité à la tuberculine pour la première fois et quelle était sa réaction à ce moment précis.

Par le *tableau III* nous avons un aperçu du nombre des observations auxquelles ces 297 enfants ont donné lieu et de la fréquence des réactions diverses par rapport à l'âge. Il serait fastidieux de suivre ces chiffres un à un; les graphiques, de par



GRAPHIQUE I. — Pourcentage des cuti-réactions positives et des intradermo-réactions (à 1/10 de milligramme) positives par rapport à l'âge des enfants. Ce graphique concerne 297 vaccinés au BCG, sans contact, représentant 833 séries complètes d'épreuves à la tuberculine.

leur nature même, sont de consultation plus rapide et agréable. Nous en donnons trois pour résumer ce dernier tableau.

Le *graphique I* montre les variations des *cuti-réactions* et *intradermo-réactions* à 1/10 de milligramme positives. Ces deux réactions sont de beaucoup les plus nombreuses et forment la majorité des réactions de sensibilité nette.

Le *graphique II* est la courbe moyenne obtenue par l'addition des deux courbes du graphique I. Il représente en ligne pointillée la même courbe moyenne obtenue par les mêmes réactions chez les enfants *BCG avec contact*.

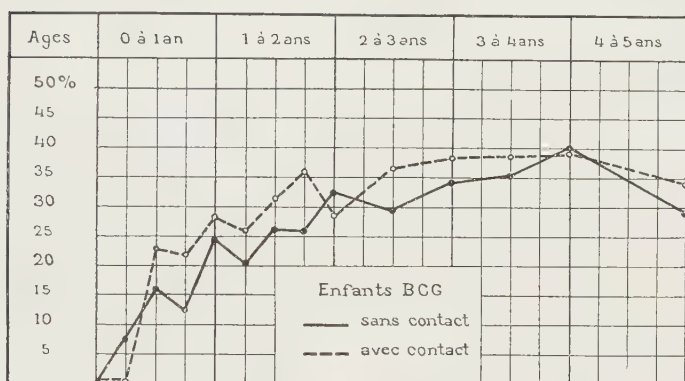
Comme il s'agit de *moyenne* nous obtenons des chiffres qui

sont nettement en dessous de la réalité. Ce qui nous intéresse surtout dans ces graphiques, en général, et dans celui-ci en particulier, c'est l'allure des courbes.

Le graphique III exprime par trois courbes les pourcentages, par rapport à l'âge, des observations de sensibilité : nette, faible et ébauchée. Pour ne pas encombrer le graphique nous avons fait abstraction de la sensibilité négative, qui est presque inexistante comme nous le verrons.

Le tableau IV donne les chiffres des pourcentages de chaque sensibilité.

Ces divers tableaux, avec leurs chiffres correspondants, se



GRAPHIQUE II. — Pourcentage des cuti-réactions positives et des intradermo-réactions à 1/10 de milligramme positives par rapport à l'âge des enfants. Ce tableau concerne des enfants vaccinés au BCG avec et sans contact.

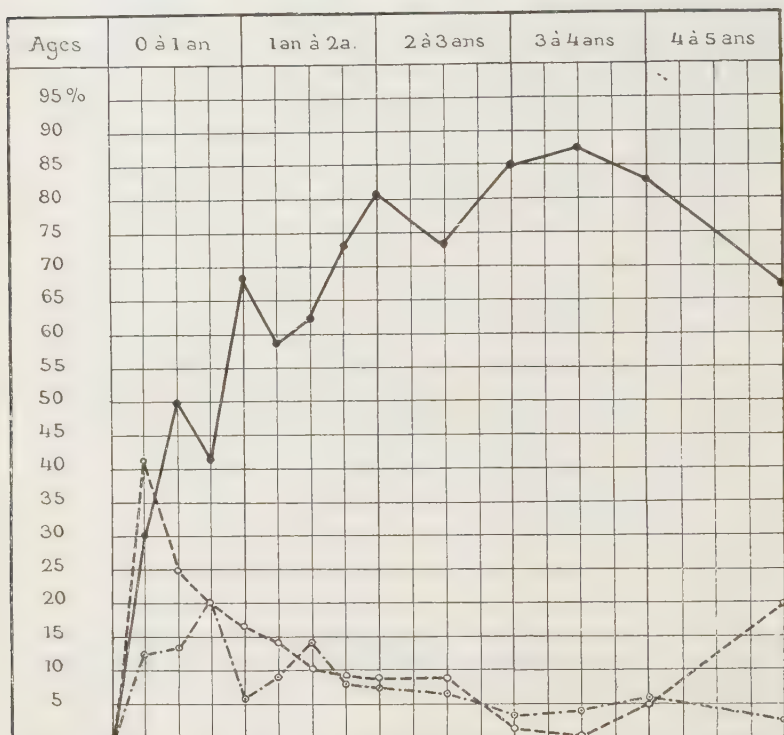
contrôlent mutuellement et prouvent que notre division en quatre sensibilités n'est pas arbitraire.

L'intérêt de notre travail consiste aussi dans le grand nombre d'enfants et d'observations. Tout le monde sait dans quelles erreurs on tombe en calculant sur de petites séries. Nous en donnerons deux exemples frappants.

Voici le premier : lors de nos observations de 1928-1929, nous n'avions que 6 enfants de zéro à trois mois, qui nous ont donné quatre cuti-réactions positives et, dans notre étude de 1930-1931, où nous avions 34 enfants du même âge (de zéro à trois mois), nous n'avons eu aucune cuti-réaction positive.

Une autre erreur, due au hasard surtout, est celle qui ne

nous donne que deux intradermo-réactions positives à 1/10 de milligramme sur 30 observations de quatre à cinq ans. Les enfants dont les observations sont marquées à cet âge, sauf quelques exceptions concernant justement les enfants à cuti-réaction positive, ne sont pas les mêmes que ceux dont les



- Cuti-Réactions + à Intra-Dermo-Réactions + à 2 mmg. Réactions Nettes
 - - - Intra-Dermo-Réactions + de 2 mmg à 1 cg. Réactions Faibles
 - - - Intra-Dermo-Réactions à 1 cg ± et 1 cg douteux. Réactions Ébauchées

GRAPHIQUE III. — Pourcentage des réactions tuberculiques nettes, faibles et ébauchées suivant l'âge. Ce graphique concerne 297 enfants vaccinés, sans contact, représentant un total de 833 séries complètes d'épreuves à la tuberculine.

observations sont marquées de trois ans et demi à quatre ans. A cet âge nous relevons 17 intradermo-réactions positives à 1/10 de milligramme sur 36 observations. Nous avons l'intime conviction que ces enfants de trois ans et demi à quatre ans, s'ils étaient revus de quatre à cinq ans, donneraient les mêmes

réactions de sensibilité nette. Et alors quelle différence de chiffres, de pourcentage ! Les 9 observations de sensibilités négatives et ébauchées de quatre à cinq ans concernent des enfants qui ont toujours eu les mêmes réactions.

Etant donnés ces faits, contrôlés par nous avec précision, nous nous garderons d'attribuer une valeur absolue aux chiffres partiels. Ce sont les résultats globaux qui retiendront plus spécialement notre attention.

Parcourons, pour commencer, le tableau I, pour contrôler ensuite nos dires par les résultats fournis par les tableaux II et III.

Il n'y a rien de particulier à dire des enfants dont la sensibilité n'a été vérifiée qu'une fois; il ne peut être question que de probabilités. Nous avons 66 de ces enfants de tous les âges. D'après la règle de fixité, il est presque certain que les 33 enfants vaccinés à sensibilité nette, dont 15 ont plus d'un an, la

Âges	0-3 mois	3-6 mois	6-9 mois	9-12 mois	12-15 mois	15-18 mois	18-21 ms	21-24 ms	22-24 ans	2 1/2-3 ans	3-3 1/2 ans	3 1/2-4 ans	4-5 ans
Cuti-Réactions + Intra-Dermo-Réactions 2 mmg +	30.	50,57	41,07	69,34	58,55	62,63	73,51	81,18	73,19	85,27	87,26	83,34	66,68
Intra-Dermo-Réactions 2 mmg + à 1 cg +	12,50	13,19	20.	6,66	9,75	14,05	8,20	7,24	6,09	3,28	4,25	5,56	3,33
Intra-Dermo-Réactions négatives	10.	3,28	13,68	1,34	10,97	7,91	4,91	2,90	.	3,26	4,24	.	6,66
Intra-Dermo-Réactions 1 cg ± et 1 cg doubtful.	42,50	25,27	19,99	17,32	14,63	10,90	9,82	8,68	9,75	1,63	.	5,55	20.

TABLEAU IV. — Pourcentage des réactions nettes, faibles, négatives et ébauchées par rapport à l'âge des enfants. Ce tableau concerne 297 enfants vaccinés, sans contact, représentant 833 séries complètes d'épreuves à la tuberculine.

Âges des Enfants	Observations Nombre	Réactions Nettes				Faibles		Négatives			Ebauchées		
		Cult. Réact. + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 1/10 mg + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 1/2 mg + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 1-2 mg + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 2-5 mg + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 5 mg-1 cg + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 2 mg + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 4 mg + Nbre et %		Intra-Dermo Réact. 1 cg + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 1 cg + Nbre et %	Intra-Dermo Réact. 1 cg + Nbre et %
0-3 mois	2	0 %	0 %	0 %	0 %	1 % 50	0 %	1 % 50	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %
3-6 mois	15	3 % 20	4 % 26.67	0 %	1 % 6.67	2 % 13.34	1 % 6.67	0 %	1 % 6.66	0 %	2 % 13.33	1 % 6.66	0 %
6-9 6-9 mois	12	4 % 22.23	4 % 22.23	3 % 16.67	1 % 5.55	1 % 5.55	0 %	0 %	2 % 11.11	0 %	3 % 16.66	0 %	0 %
9-12 mois	16	4 % 25	5 % 31.25	0 %	0 %	0 %	3 % 18.75	1 % 6.25	0 %	1 % 6.25	2 % 12.50	0 %	0 %
12-15 mois	23	9 % 39.14	3 % 13.05	2 % 8.69	3 % 13.04	2 % 8.63	1 % 4.35	0 %	1 % 4.25	2 % 8.69	0 %	0 %	0 %
15-18 mois	11	2 % 18.18	5 % 45.45	0 %	0 %	0 %	1 % 9.09	0 %	1 % 9.09	0 %	2 % 18.18	0 %	0 %
18-21 mois	22	7 % 31.82	9 % 40.91	1 % 4.55	0 %	1 % 4.55	0 %	0 %	0 %	0 %	1 % 4.54	3 % 13.63	0 %
21-24 mois	23	10 % 43.52	3 % 13.04	3 % 13.04	1 % 4.35	0 %	1 % 4.34	0 %	1 % 4.34	0 %	3 % 13.03	1 % 4.34	0 %
2-2 1/2 ans	46	23 % 50	10 % 21.74	1 % 2.17	4 % 8.70	1 % 2.18	1 % 2.18	0 %	2 % 4.34	1 % 2.17	2 % 4.34	1 % 2.17	0 %
2 1/2-3 ans	36	18 % 50	9 % 25	2 % 5.55	0 %	0 %	1 % 2.78	0 %	0 %	1 % 2.78	4 % 11.11	1 % 2.78	0 %
3-3 1/2 ans	31	15 % 48.39	8 % 25.81	2 % 6.42	1 % 3.23	1 % 3.22	0 %	0 %	0 %	3 % 9.67	1 % 3.22	0 %	0 %
3 1/2-4 ans	21	13 % 61.91	3 % 14.29	0 %	0 %	0 %	1 % 4.76	1 % 4.76	1 % 4.76	1 % 4.76	1 % 4.76	0 %	0 %
4-5 ans	13	7 % 53.85	2 % 15.39	0 %	0 %	0 %	1 % 7.69	0 %	0 %	2 % 15.38	1 % 7.69	0 %	0 %
Total	277	115 % 41.52	65 % 23.47	14 % 5.06	11 % 3.98	9 % 3.25	11 % 3.97	3 % 1.08	9 % 3.24	11 % 3.97	22 % 7.94	7 % 2.52	0 %
		74.03 %				7.22 %		8.29 %		13.46 %			

TABLEAU V. — Nombre des observations faites à chaque âge et pourcentage des réactions positives aux différentes épreuves. Ce tableau concerne 128 enfants ayant subi un contact tuberculeux, représentant 277 séries complètes d'épreuves à la tuberculine.

conserveront telle. Il en sera de même pour les 6 enfants à sensibilité faible. Quant aux 4 enfants à sensibilité négative, 2 sont des *négatifs stables* (nous parlerons plus loin en détail des négatifs). Les deux autres sont âgés, l'un de cinq semaines, l'autre d'à peine deux mois. Disons tout de suite que nous parlons d'enfants âgés de zéro à trois mois. Mais 4, sur nos 40 enfants, ont entre un et deux mois, les 36 autres ont de deux à trois mois. Les deux enfants à sensibilité négative dont nous venons de parler peuvent fort bien être en période anté-allergique. Ils ne compteront donc pas dans les négatifs définitifs. Nous savons, par notre tableau II, que 17 enfants de zéro à trois mois, faisant partie des 66 enfants, ont une sensibilité ébauchée; eux aussi peuvent révéler une sensibilité faible ou nette un peu plus tard. Il ne reste donc, de cette catégorie, que $23 - 17 = 6$ enfants

Âges	0-3 mois	3-6 mois	6-9 mois	9-12 mois	12-15 ms	15-18 ms	18-21 ms	21-24 ms	2-2 1/2 ans	2 1/2-3 ans	3-3 1/2 ans	3 1/2-4 ans	4-5 ans
Cuti-Réactions + Intra-Dermo-Réactions 2mmg +	0 %	53.33	66.67	56.25	73.92	63.64	77.28	73.91	82.61	80.56	83.88	76.20	69.24
Intra-Dermo-Réactions 2mmg à 1cg +	50	20	5.56	18.75	13.04	9.09	4.54	4.34	4.35	2.78	3.22	4.76	7.69
Intra-Dermo-Réactions négatives	50	6.67	11.11	12.50	13.05	9.09	0.	4.34	4.35	2.78	9.68	14.28	15.38
Intra-Dermo-Réactions 1cg et 1cg dont	0	20	16.6	12.50	0.	18.18	18.18	17.40	8.69	13.88	3.22	4.76	7.69

TABEAU VI. — Pourcentage groupé par âge des sensibilités à la tuberculine, nette, faible, négative et ébauchée concernant 128 enfants vaccinés, ayant subi un contact tuberculeux et représentant 277 séries complètes d'épreuves tuberculiniques.

dont la sensibilité semble devoir être considérée comme ébauchée définitivement, ces 6 enfants étant plus âgés.

En ce qui regarde les 78 enfants dont la sensibilité a été établie à deux reprises, ce que nous venons de dire reste vrai pour les 39 enfants à sensibilité nette, les 15 enfants à sensibilité faible. L'enfant négatif, d'après son âge, doit être considéré comme un *négatif stable*. Il s'agit, pour les 23 enfants à sensibilité ébauchée, d'enfants dont la sensibilité est restée ébauchée une deuxième fois, pour certains, entre six et neuf mois et, pour les autres, de neuf à douze mois. Il y a beaucoup de chances, croyons-nous, pour que leur sensibilité ne devienne pas nette; pour quelques-uns peut-être, à période anté-allergique longue, elle deviendra faible. Mais ceci fait partie du domaine des suppositions.

Des 80 enfants éprouvés à trois reprises à la tuberculine, on peut dire avec une quasi-certitude que les 49 enfants à sensibilité nette, les 18 à sensibilité faible et les 12 à sensibilité ébauchée conserveront leurs sensibilités respectives. Le négatif est un *négatif stable*.

Quant aux enfants vus quatre, cinq, six et sept fois, nous estimons que le doute n'est pas possible, puisque toutes leurs épreuves nous ont toujours donné des résultats semblables. Chaque fois, nous avons une majorité impressionnante de sensibilités nettes.

Nous pensons que les sensibilités ébauchées doivent être comptées dans les réactions positives, quoique très faibles. Nous avons vu que jamais de vrais enfants-témoins ne présentaient de réactions analogues et que, par contre, nous les retrouvions parfois chez quelques enfants-témoins avec contact. Ces enfants à sensibilité ébauchée ne restent donc pas indifférents à la tuberculine, bien que leur allergie ne soit pas suffisante pour se manifester par une sensibilité plus nette. Cette sensibilité ébauchée doit être en rapport avec l'action d'un bacille de Koch, peu virulent chez les enfants-témoins avec contact et avec l'action du vaccin BCG chez les enfants vaccinés sans contact.

Si nous prenons les résultats globaux du tableau I, nous avons :

Résultats positifs : 287 enfants = 96,64 p. 100.

Sensibilité nette	180 enfants.
Sensibilité faible.	42 enfants.
Sensibilité ébauchée.	65 enfants.

Résultats négatifs : 10 enfants = 3,36 p. 100.

Négatifs stables	8 enfants = 2,69 p. 100.
Négatifs, encore indéterminés. . .	2 enfants.

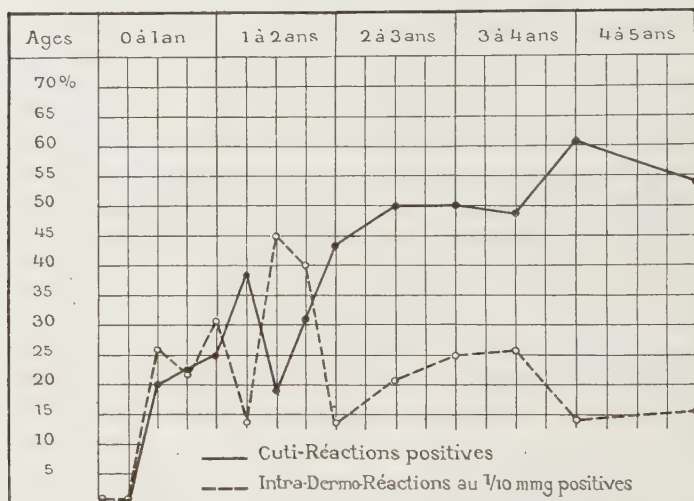
En chiffres ronds, nous pouvons dire que nous relevons 97½ p. 100 d'enfants à réaction positive et 3 p. 100 à réaction négative.

Nous disions tout à l'heure que 2 des 10 enfants négatifs ne comptaient pas, vu leur jeune âge, et que chez 8 enfants seulement nous pouvions parler de résultats négatifs stables. Ce sont de grands enfants qui ont toujours été franchement négatifs à 1 milligramme de tuberculine par intradermo-réaction en 1928-1929. En 1930, nous n'avons pas éprouvé leur sensibilité au delà de 4 milligrammes ; nous les considérons cependant comme négatifs stables parce que leurs réactions ont été franchement négatives à cette dose et que, chez les enfants à sensibilité ébauchée, les réactions de 4 milligrammes n'ont pas ce caractère négatif absolu. Nous avons donc le droit d'affirmer que, dans l'état actuel de nos recherches sur la sensibilité à la tuberculine, 3 p. 100 environ des enfants ne sont pas sensibles à la tuberculine.

Ainsi, alors que l'allergie provoquée par le bacille de Koch dans la contamination naturelle se traduit en général par une sensibilité à la tuberculine qui est extrêmement nette, il n'en est pas de même chez l'enfant vacciné au BCG. Tandis que, chez l'enfant contaminé, il suffit de pratiquer une cuti-réaction de Pirquet pour voir apparaître une réaction assez vive et qu'il y a peu de différence entre les réponses des cuti-réactions et celles des intradermo-réactions, chez l'enfant vacciné par le BCG et sans contact tuberculeux, cette allergie est variable dans ses manifestations cutanées. Nous distinguons ici plusieurs degrés dans les réactions cutanées positives, correspondant aux sensibilités : nette, faible, ébauchée. Nous savons que, chez chaque enfant, cette sensibilité est fixe, dans les limites d'âge

de notre observation lorsque l'état d'allergie est bien établi. Pourquoi cette sensibilité est-elle tantôt nette, tantôt faible? Nous l'ignorons. Nous avons vu, par exemple, deux jumelles de cinq ans, enfants en bonne santé, dont l'une est particulièrement florissante. C'est une blonde, sa peau se colore un peu au soleil; elle a toujours eu une sensibilité ébauchée. Sa sœur, qui est brune, a toujours réagi par des cuti-réactions ++ et +++ (1).

Avant de discuter l'ensemble de nos travaux, disons que, sur les tableaux II et III, nous trouvons une colonne marquée



GRAPHIQUE IV. — Pourcentage des cuti-réactions positives et des intradermo-réactions positives (au 1/10 de milligramme) d'après l'âge des enfants. Ce graphique concerne 128 enfants vaccinés, ayant subi un contact tuberculeux et représentant 277 séries complètes d'épreuves à la tuberculine.

Cuti-réactions négatives, intradermo-réactions au 1/10 de milligramme négatives. Pour le tableau II, il s'agit d'enfants dont la première réaction faite est marquée ainsi. Pour le tableau III, il s'agit de la répétition des observations prises à plusieurs reprises sur les mêmes enfants marqués à des âges différents.

(1) Nous ne pouvons cependant pas dire que le facteur *brun* ou *blond* joue un rôle dans la réaction cutanée de l'expression de l'allergie. Sur nos 297 enfants il y en a certainement les deux tiers qui sont bruns; mais, parmi le tiers d'enfants blonds, il y a beaucoup d'enfants à sensibilité nette. Les 8 enfants négatifs stables sont 5 enfants bruns et 3 enfants très blonds.

Disons tout de suite que, sur 25 de ces réactions marquées sur le tableau II, 15 sur 18 marquées jusqu'à dix-huit mois deviennent des sensibilités nettes, 2 sont des négatifs stables, 1 une sensibilité faible. Les sept autres, de dix-huit à trente mois, sont : 3 négatifs stables, 3 sensibilités ébauchées, 1 sensibilité faible.

Comparons les pourcentages des réactions globales des tableaux I, II, III.

	SENSIBILITÉ nette p. 100	SENSIBILITÉ faible p. 100	SENSIBILITÉ ébauchée p. 100	SENSIBILITÉ négative p. 100
Tableau I.	60,61	14,15	21,88	3,36
Tableau II	53,53	18,87	18,50	9,10
Tableau III.	64,72	15	14,50	5,88

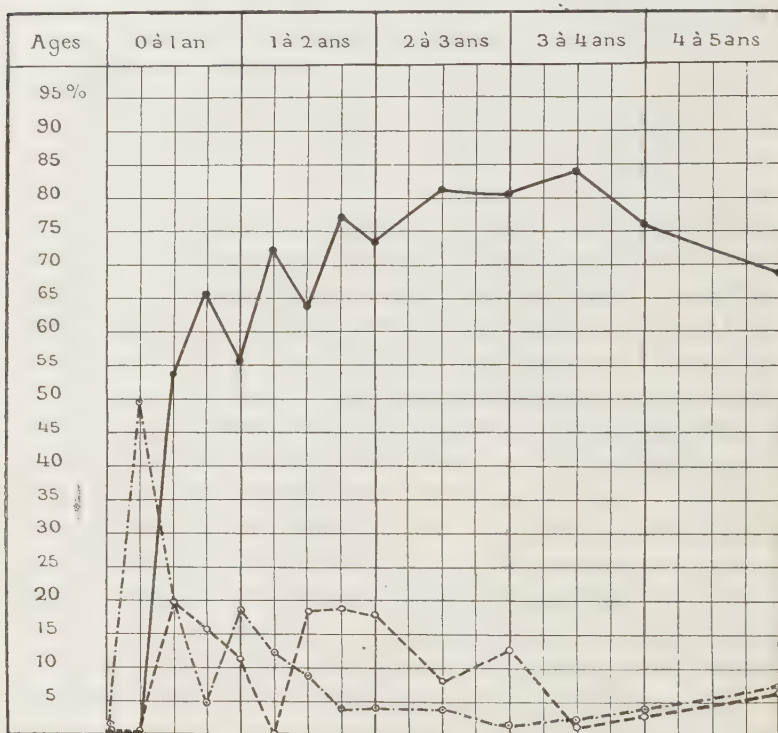
Si nous pensons aux 25 enfants marqués : *cuti-réactions négatives* sur le tableau II, dont 15 sont des enfants à sensibilité nette, nous obtenons avec cette unique rectification 58,59 p. 100 de sensibilités nettes pour le tableau II. Il y a donc une grande analogie entre les pourcentages de sensibilités nettes des trois tableaux. Il y a un petit excédent en faveur de la sensibilité nette du tableau III, puisque nous comptons par observations et qu'il y a une prédominance d'enfants à sensibilité nette. Pour la sensibilité faible, les chiffres sont presque égaux si nous décomptons, des sensibilités faibles du tableau II, les *cuti-réactions négatives* qui font partie des enfants à sensibilité nette que nous avons ajoutés pour obtenir le chiffre 58,59 p. 100 de sensibilités nettes au tableau II.

En ce qui concerne les sensibilités négatives du tableau I, nous savons déjà qu'en réalité le chiffre est 2,69 p. 100. Nous avons, pour cette même sensibilité, 9,10 p. 100 au tableau II, où les enfants sont marqués par leur première réaction, et nous en avons 27 marqués à 2 milligrammes, 4 milligrammes et 1 centigramme négatifs. Nous savons que 8 seulement sont à compter comme négatifs stables, les autres étant des enfants à sensibilité ébauchée ayant eu ces réactions négatives sur lesquelles nous nous sommes déjà expliqués. Le tableau III, qui donne les résultats par observations, a forcément un léger excédent sur nos 3,36 p. 100 du tableau I. Ce que nous venons de dire explique les légères divergences des pourcentages des trois tableaux pour la sensibilité ébauchée, sans oublier que,

des 65 enfants marqués à sensibilité ébauchée sur le tableau I, il y en a plusieurs qui, vus une fois seulement, encore très petits, n'ont pas leur allergie bien établie, ce qui explique notre chiffre de 21,88 p. 100.

*
* *

Tels sont donc les résultats globaux. Voyons maintenant,



— Cuti-Réactions + Intra-Dermo-Réactions de 2 mmg. + Réactions Nettes
 - - - Intra-Dermo-Réactions de 2 mmg + à 1 cg +. Réactions faibles
 - - - Intra-Dermo-Réactions de 1 cg ± et 1 cg douteuses. Réactions Ebauchées

GRAPHIQUE V. — Pourcentage des réactions nettes, faibles et ébauchées par rapport à l'âge de l'enfant. Ce graphique concerne 128 enfants vaccinés au BCG, ayant subi un contact tuberculeux, qui représentent 277 séries complètes d'épreuves à la tuberculine.

cette fois en nous basant sur l'ensemble des observations faites, à quel âge nous voyons s'établir l'allergie? Ce sont les graphiques qui vont nous renseigner.

Disons d'emblée, pour tous les graphiques, que nous négligerons les irrégularités des courbes dues à des chiffres qui, quoique respectables, ne font pas partie des grands nombres et aussi à ce fait que les mêmes enfants ne sont pas revus aux mêmes âges.

Ceci dit, prenons le graphique III qui nous montre l'évolution des sensibilités nette, faible et ébauchée. Nous voyons que la sensibilité nette s'établit progressivement pour atteindre une moyenne de 44 p. 100 à six mois, de 60 p. 100 à un an et de 75 p. 100 à deux ans, niveau qu'elle dépassera encore pour ne point le garder du reste; mais la baisse accusée plus tard, de quatre à cinq ans, est due au hasard. Si beaucoup d'enfants atteignent leur seuil de sensibilité définitive en deux ans, c'est malgré tout à partir de deux ans que nous avons un optimum. Les sensibilités ébauchées qui ont un maximum de 42 p. 100 à trois mois diminuent progressivement jusqu'à deux ans, ce maximum représentant en majorité des enfants dont l'allergie s'établit plus lentement. Si nous pensons à la courbe des sensibilités négatives, absente de ce graphique, où la majorité des observations se rapportent à des sensibilités ébauchées, nous obtiendrons, à partir de deux ans, une moyenne de 16 p. 100 environ de sensibilités ébauchées, fixes de deux à cinq ans.

Le graphique I nous donne les réactions positives des cuti- et intradermo-réactions au 1/10 de milligramme; ces deux catégories de réactions forment la majorité des réactions de sensibilité nette. La ligne pleine, qui donne les pourcentages des cuti-réactions positives, indique 10 p. 100 à trois mois pour atteindre 13 p. 100 à un an. A partir de cet âge, elle est en progression presque régulière. Nous faisons abstraction de la baisse marquée de deux ans à deux ans et demi et la remplaçons par une moyenne idéale qui nous donne 29 p. 100 à deux ans, moyenne qui se maintiendra jusqu'à trois ans pour s'élever à 50 p. 100 vers cinq ans.

La ligne pointillée des pourcentages des intradermo-réactions positives au 1/10 de milligramme atteint, en comptant par moyenne idéale, 19 p. 100 à six mois et 34 p. 100 à un an. Ce niveau, à peu de chose près, se maintiendra jusqu'à cinq ans. Nous savons ce qu'il faut penser de la baisse brusque de quatre

à cinq ans, de ces pourcentages. Elle n'est pas à prendre en considération.

Le graphique II, qui nous donne la moyenne de ces deux pourcentages, nous montre la progression régulière, avec un maximum cependant d'allergie s'établissant entre zéro et un an. A partir de deux ans, on peut considérer comme stables les pourcentages de sensibilité nette, fixe. C'est intentionnellement que nous ne mentionnons pas de chiffres ici. L'allure de la courbe est franche et parlante par elle-même.

Ces 3 graphiques nous montrent que l'allergie, exprimée par les pourcentages de sensibilité nette, va en progressant jusqu'à deux ans, avec un maximum de progression de zéro à un an. *A partir de deux ans, nous pouvons considérer l'allergie comme établie, devenue fixe.* Seules, les cuti-réactions positives, exprimant une sensibilité particulièrement nette, sont encore en légère progression après deux ans. Si nous consultons le tableau n° 3, nous voyons qu'en prenant les 36 enfants sur les 40 âgés de zéro à trois mois à réaction positive (nette, faible et ébauchée), nous avons 90 p. 100 d'enfants qui réagissent; de trois à six mois, 96,70 p. 100. Nous ne fatiguerons pas le lecteur par l'énumération des chiffres correspondant aux autres âges. Nous savons que le facteur « hasard » va maintenant entrer en jeu pour augmenter ou diminuer légèrement les chiffres, puisque les mêmes enfants ne sont pas forcément revus aux mêmes âges. Mais nous savons aussi avec quel soin nous avons déterminé les sensibilités marquées sur le tableau I, et qu'il nous donne une moyenne de 97 p. 100 de réactions positives. Il était intéressant de se rendre compte que, déjà chez les enfants de zéro à trois mois, et qui ont en moyenne dix semaines, nous avons 90 p. 100 de réactions positives où la sensibilité nette est cependant en minorité. De trois à six mois, nous obtenons un pourcentage 96,70 p. 100 où la sensibilité nette représente 50 p. 100. L'ensemble des sensibilités positives va rester stationnaire, mais les réactions nettes vont en former, toujours plus, la majorité. C'est vers l'âge de deux ans que nous obtenons un maximum qui restera à peu près stable comme nous l'ont prouvé nos trois graphiques.

Nous savons, par le comportement de nos enfants, résumés par le tableau I, que *nous n'avons pas d'exemples à fournir*

d'enfants qui, ayant acquis une sensibilité à la tuberculine, l'aient perdue dans nos limites d'observation, soit jusque vers cinq ans.

Nos observations de 1928-1929, faites sur un nombre d'enfants plus limité, avec des doses de tuberculine plus faibles, des réactions qui n'étaient pas faites en série et surtout un temps d'observation plus court, nous avaient amenés à des conclusions un peu différentes de celles d'aujourd'hui.

Alors déjà, nous avions pressenti, même affirmé, que la majorité des enfants ayant ingéré le vaccin BCG réagissaient à la tuberculine, et nous pensions bien que notre chiffre de 11,4 p. 100 d'enfants à réactions négatives était exagéré.

Un fait nouveau, qui ressort de nos observations portant sur trois ans d'expériences, est que *l'allergie de l'enfant ne va pas en diminuant*, comme d'autres auteurs et nous-mêmes l'avions cru. Nous savons maintenant que cette allergie atteint un degré particulier chez chaque enfant et s'y maintient dans les limites d'âges où nos observations ont porté, c'est-à-dire *cinq ans*. On peut diviser cette allergie en quatre groupes de sensibilités : *nette, faible, ébauchée et négative*. La période anté-allergique est relativement courte pour la majorité des enfants. A trois mois et six mois, nous avons déjà 90 p. 100 et 96,70 p. 100 de réactions positives, parmi lesquelles la sensibilité nette représente, dans ces pourcentages, 30 p. 100 et 50 p. 100, alors qu'à partir de deux ans, où 97 p. 100 de nos enfants réagissent positivement, les réactions de sensibilités nettes sont fortement dominantes et vont jusqu'à 87,26 p. 100 de trois ans à trois ans et demi.

Quoique, dans l'ensemble, l'enfant ayant ingéré le vaccin BCG devienne allergique vers trois mois, il faut tenir compte des cas exceptionnels où l'allergie n'est décelable qu'à six, huit et même douze mois. Cette notion est importante à retenir pour fixer la période pendant laquelle on peut craindre que le vaccin ne protège pas l'enfant vacciné ou ne le protège qu'insuffisamment.

**Étude de la sensibilité à la tuberculine
chez les enfants vaccinés au BCG
ayant subi un contact tuberculeux.**

Du mois de mai 1930 au mois de décembre 1931, nous avons fait subir les épreuves tuberculiniques à 128 enfants vaccinés d'après la méthode de M. Calmette et *ayant subi un contact tuberculeux*.

L'âge d'entrée de ces enfants au Placement familial des Tout-Petits est assez variable. Certains enfants, de père tuberculeux, arrivent tout petits avec leur mère qui les nourrit pendant quelques semaines au centre du Placement familial. Malgré cette séparation précoce du parent malade, le contact, quoique court, a pu être infectant.

D'après leur âge d'entrée au Placement familial, les enfants se répartissent ainsi :

AGE D'ENTRÉE	NOMBRE D'ENFANTS	CONTACT INTIME p. 100
0 à 3 mois	23	26
3 à 6 mois	25	32
6 à 9 mois	21	42
9 à 12 mois	13	38
12 à 15 mois	14	42
15 à 18 mois	10	55
18 à 24 mois	14	51
2 ans à 2 ans 1/2	128	26

L'origine et la nature du contact sont les suivantes :

	CONTACTS INTIMES	CONTACTS LÉGERS
Contacts de père	79	24
Contacts de mère	43	25
Contacts de père et mère.	6	3
	128	52
		76

Le grand nombre de contacts intimes lorsque la mère est malade, le pourcentage progressif de ces contacts par rapport à l'âge d'entrée au Placement familial, n'ont rien pour nous surprendre.

Personnellement, nous avons vu 36 de ces enfants de

zéro à douze mois, donnant 51 observations. 6 d'entre eux ont eu, très vite après leur admission, une cuti-réaction ++. Il est possible que le vaccin ingéré ait agi partiellement pour créer cette allergie, mais nous croyons avant tout que le contact humain a dû être efficace. Jamais nous n'avons vu, chez d'aussi jeunes enfants vaccinés au BCG, et sans contact, des cuti-réactions ++ et persistant ++.

Afin de donner toute leur valeur aux observations des *enfants sans contact*, nous avons procédé à un classement rigoureux, ne gardant dans cette rubrique que les sujets dont la séparation ne laissait aucun doute. La contre-partie de ce classement très strict se fait sentir dans notre groupe d'enfants BCG avec contact. Il contient, croyons-nous, un assez grand nombre d'enfants chez lesquels le contact n'a pu agir et qui, de ce fait, vont fausser la statistique des tableaux suivants.

Lors de la période d'observation que les *enfants avec contact* doivent passer dans une crèche avant leur admission au Placement familial des Tout-Petits, il est facile de classer un enfant *témoin avec contact* dans les *enfants non contaminés*, si ses cuti-réactions restent négatives ainsi que ses radiographies. Ce sera beaucoup plus difficile pour les enfants ayant été vaccinés par le BCG. Si leurs cuti-réactions ainsi que leurs radiographies restent négatives, que, de plus, il s'agisse de très jeunes enfants, ils peuvent fort bien être en période anté-allergique et présenter, peu après leur admission, des cuti-réactions positives. Comment savoir la part qui revient au vaccin ingéré et celle qui revient à la contamination ? Deux points nous paraissent capitaux, dont l'un n'a d'intérêt que par rapport à l'âge : à savoir l'âge d'apparition de la cuti-réaction positive et, ensuite, la stabilité et l'intensité de cette cuti-réaction. Nous avons vu, chez les *enfants BCG sans contact*, qu'à six mois nous avions 10 p. 100, et à un an 13 p. 100 de cuti-réactions positives ; notre maximum apparaît à partir de deux ans. De plus, nous avons vu que les *enfants BCG sans contact* étaient sujets à des variations dans les réactions positives de leurs sensibilités. Nous savons aussi qu'un vacciné, séparé, peut avoir des cuti-réactions très positives ++ et +++, mais elles se stabilisent toujours à une réaction simplement « + ». *Chez l'enfant BCG qui a subi un contact infectant, la cuti-réaction, non seulement*

sera précoce, mais se maintiendra positive, sans oscillations, et en général sera ++.

Les 128 enfants *BCG avec contact* donnent lieu à 277 observations du mois de mai 1930 au mois de décembre 1931 (tableau V). Ce sont des chiffres bien inférieurs à ceux dont nous avons disposé pour parler des *enfants BCG sans contact*. Nous ne ferons pas de commentaires à leur sujet, qui n'apporteraient que des répétitions à bien des égards. L'intérêt réside, ici, avant tout, en la comparaison des courbes des graphiques correspondants pour les *enfants BCG sans contact et avec contact*. Certaines différences sont très accusées malgré les nombres restreints, et le fait que bien des enfants marqués *avec contact* se comportent comme des *enfants BCG sans contact* prouve que, pour eux, selon toutes les probabilités, le contact n'a pas été agissant. Pour les enfants *sans contact* nous avons vu que 97 p. 100 réagissaient à la tuberculine et nous trouvons un chiffre inférieur : 91,70 p. 100 chez les enfants *BCG avec contact*. Ce n'est là qu'une question de coïncidence due aux chiffres relativement peu élevés et à la répétition d'observations chez des enfants à réactions négatives. Nous ne nous y arrêterons pas, et nous allons comparer l'allure des courbes des graphiques correspondants chez ces deux sortes d'enfants. Les graphiques III et V, qui donnent les courbes de sensibilités nette, faible et ébauchée, montrent une grande analogie pour les courbes de sensibilités faible et ébauchée. La courbe des réactions de sensibilité nette montre une différence, mais elle est légère. Pour les enfants *BCG sans contact*, nous avons trouvé, à l'âge de six mois, une moyenne de 44 p. 100 de sensibilité nette; pour les enfants *BCG avec contact* nous trouvons 54 p. 100 au même âge. A un an, les premiers donnent 60 p. 100 et les enfants *avec contact* une moyenne de 65 p. 100. A partir de deux ans les chiffres sont très semblables, avec un léger excédent qui se maintient pour nos enfants *BCG avec contact*. La comparaison des graphiques I et IV va nous renseigner sur la qualité des réactions de sensibilité nette. Nous avons déjà vu que la majorité des réactions de sensibilité nette chez les enfants *BCG sans contact* est représentée par les cuti-réactions et intradermo-réactions au 1/10 de milligramme positives. Cette sensibilité nette s'accuse surtout pour les cuti-réactions positives, à partir de deux ans. Pour les enfants *BCG avec*

contact, nous atteignons d'emblée 20 p. 100 de cuti-réactions positives, puis 30 p. 100; à deux ans, 45 p. 100 et 50 p. 100 à deux ans et demi, niveau qui ne s'abaissera plus. Il atteindra une limite extrême de 61 p. 100 à quatre ans, tout comme il atteint cette limite extrême de 50 p. 100 à cinq ans chez les enfants *BCG sans contact*. Dans l'ensemble nous pouvons dire qu'à partir de deux ans les pourcentages des cuti-réactions positives sont stables dans les deux catégories d'enfants, avec un excédent de 15 p. 100 environ de cuti-réactions positives chez les *enfants avec contact*.

La courbe correspondante des intradermo-réactions donne un léger excédent de réactions positives chez les *enfants avec contact* jusqu'à vingt et un mois; après cette période, le niveau moyen chez ces enfants descendra à 25 p. 100, et se fixera à 35 p. 100 pour les *enfants sans contact*.

Nous en concluons que, pour un certain nombre des *enfants avec contact*, ce contact a renforcé l'action du vaccin, puisque l'allergie est exprimée par une majorité de cuti-réactions positives. Prenons le graphique n° 11, qui nous montre les moyennes des cuti-réactions et intradermo-réactions au 1/10 de milligramme positives des *enfants sans et avec contact*. Nous retrouvons ici que l'apparition des réactions fortes est plus rapide chez les enfants ayant eu des contacts. Différence très visible à six mois déjà, et qui persiste jusqu'à vingt et un mois. Puis les courbes sont presque parallèles (nous négligeons toujours volontairement les quelques irrégularités). L'excédent, qui, d'un bout à l'autre de la courbe, est en faveur des *enfants BCG avec contact*, prouve l'action évidente du contact subi. Ce contact renforce l'action du vaccin, nous en avons une preuve par la plus grande rapidité avec laquelle apparaît une sensibilité nette chez les enfants BCG avec contact et le plus grand nombre de réactions positives dans cette catégorie d'enfants.

Les sensibilités faibles et ébauchées sont en pourcentage un peu inférieur chez les *enfants avec contact*. Si nous disposions d'un nombre équivalent d'enfants des deux catégories, les différences seraient certainement plus accusées.

Sur notre tableau V, nous voyons 23 observations négatives. 17 de ces observations concernent 12 enfants dont les cuti-réactions sont marquées : I. D. 1 centigramme \pm ou

douteux. Ils font, en réalité, partie des enfants à sensibilité ébauchée. 6 observations ont trait à 4 enfants qui sont des négatifs stables. Or, 4 enfants négatifs sur 128 enfants nous donnent 3,12 p. 100. C'est un léger excédent de négatifs pour un seul négatif stable des *enfants BCG sans contact*, où nous avons 2,69 p. 100. N'avons nous pas le droit de dire que le chiffre obtenu signifie simplement la similitude des pourcentages de négatifs stables dans nos deux catégories d'enfants?

Plusieurs points ressortent de notre étude sur les *enfants BCG avec contact* :

1° *La date d'apparition des sensibilités nettes est plus courte que pour les enfants vaccinés sans contact.*

2° Les enfants ayant subi un contact agissant auront en majorité des cuti-réactions positives qui resteront, en général, ++++. Nous ne voyons pas, chez ces enfants, les mêmes variations des réactions positives (dans les limites de leur sensibilité) que nous avons signalées chez les enfants *BCG sans contact*.

3° Nos chiffres de cuti-réactions positives sont inférieurs à ceux qu'accusent la plupart des auteurs. Ceci résulte du fait que notre groupe d'*enfants BCG avec contact* n'est pas homogène ; il contient un certain nombre d'enfants chez lesquels le contact n'a pas été actif et qui, de par leur admission au Placement familial des Tout-Petits, ont échappé à toute cause de contamination tuberculeuse ultérieure.

Conclusions.

Notre étude sur la sensibilité cutanée à la tuberculine chez les enfants ayant ingéré le vaccin BCG a été faite dans des conditions rigoureuses. Nous disposons d'un grand nombre d'enfants, protégés pour la plupart par la prophylaxie anténatale et élevés par les soins de l'Œuvre de Placement familial des Tout-Petits, avant qu'aucun contact fâcheux puisse intervenir. Nous savons, en outre, par nos 193 enfants témoins non vaccinés, que les enfants ne subissent aucun contact tuberculeux durant leur séjour dans les centres du Placement familial. Ces 193 enfants témoins ont présenté des réactions strictement négatives vis-à-vis de toutes les épreuves à la tuberculine

auxquelles ils ont été soumis. L'importance de ce nombre élevé de témoins est tout d'abord capitale pour la démonstration de la valeur de notre technique. Il en ressort, en outre, que l'enfant vacciné ne peut avoir de réactions positives à la tuberculine que grâce à l'action des bacilles-vaccins qu'il a absorbés.

Nous avons étudié 297 enfants qui ont ingéré le vaccin BCG et qui n'ont subi aucun contact tuberculeux. Ils ont donné lieu à 833 observations. Lors de chacune de ces observations, l'enfant a subi toute la gamme des cuti-réactions et intradermo-réactions, jusqu'à l'introduction d'un centigramme de tuberculine brute de l'Institut Pasteur dans le derme de l'avant-bras.

L'avantage de ce procédé par séries de réactions à doses croissantes, allant de 1/10 de milligramme à 1 centigramme de tuberculine, est de déterminer avec précision comment chaque enfant réagit à la tuberculine à un moment donné.

Nous savons que 97 p. 100 des enfants vaccinés et sans contact tuberculeux présentent des réactions positives à la tuberculine. 3 p. 100 restent incapables de réagir à cette dose.

Suivant la dose de tuberculine qui provoque une réaction positive, nous avons groupé les enfants en trois catégories qui correspondent à des sensibilités décroissantes, soit :

1° *Sensibilité nette*, qui va d'une cuti-réaction positive à une intradermo-réaction à 2 milligrammes positive ;

2° *Sensibilité faible*, qui correspond à une intradermo-réaction de 2 milligrammes à 1 centigramme positive ; et enfin :

3° *Sensibilité ébauchée*, où l'intradermo-réaction à 1 centigramme est notée comme \pm ou douteuse. Nous rappellerons que nous n'avons jamais vu de réaction dite de sensibilité ébauchée chez un enfant témoin *sans contact*, mais que nous avons observé ce type de réactions chez certains enfants témoins *avec contact*. Beaucoup de nos tout petits commencent par avoir ces réactions un peu troublantes, puis manifestent une sensibilité nette peu après. L'absence absolue de ces réactions chez les *enfants témoins sans contact*, leur fréquence chez les enfants *vaccinés*, nous autorisent à considérer ces réactions comme positives, quoique très faibles.

Nos 97 p. 100 d'enfants vaccinés à réactions positives comprennent ceux qui présentent une sensibilité nette, faible ou ébauchée. En tenant compte de l'âge, nous voyons qu'à trois

mois déjà, nous avons, par cette addition, 73 p. 100 d'enfants qui réagissent à la tuberculine, 89 p. 100 à six mois et 91 p. 100 à un an ; et nous atteignons, à deux ans, 97 p. 100, notre maximum.

Les enfants à sensibilité nette sont en minorité à trois mois ; ils représentent la moitié du nombre total des réactions positives à six mois, et, après six mois, ils deviennent la majorité.

C'est vers dix-huit mois à deux ans que nous observons notre plus grand nombre d'enfants à sensibilité nette. A partir de cet âge, le pourcentage des sensibilités nettes ne varie plus. La sensibilité à la tuberculine reste toujours la même.

Une fois l'allergie bien établie, la sensibilité acquise par l'enfant reste fixe, chez certains enfants nette, chez d'autres faible, chez d'autres ébauchée ; *elle ne variera plus jusqu'à l'âge de cinq ans*, qui représente, pour notre étude, la limite d'âge.

Nous n'avons aucun exemple à fournir d'enfants dont la sensibilité nette soit devenue par la suite négative, ou même ébauchée.

Il résulte donc de ce travail que *97 p. 100 des enfants vaccinés par absorption buccale du BCG réagissent à la tuberculine* ; que l'établissement de cette allergie est, en général, relativement rapide (avant l'âge de trois mois), mais qu'elle peut être plus lente ; qu'une fois établie, *la sensibilité*, quel que soit son degré (et il est variable), *reste fixe* ; que, *jusqu'à cinq ans*, en tout cas, *l'enfant qui réagit à la tuberculine reste en état allergique*. *La symbiose qui s'établit entre le bacille-vaccin et l'organisme de l'enfant paraît donc durable.*

RECHERCHES SUR LE PHÉNOMÈNE DE TWORT-D'HÉRELLE (BACTÉRIOPHAGIE)

par E. WOLLMAN et M^{me} E. WOLLMAN

(TROISIÈME MÉMOIRE) [1]

Nous avons exposé, à diverses reprises (2), les objections qui, s'accumulant peu à peu devant l'hypothèse parasitaire de la bactériophagie, la rendaient de moins en moins acceptable et nous avons examiné les différentes tentatives faites pour expliquer ce phénomène autrement que par l'action d'un virus ultramicroscopique parasite.

Des apports récents au problème de la bactériophagie achèvent de démontrer l'inanité de la théorie parasitaire et permettent, à notre avis, de la rejeter définitivement. Le problème même gagne ainsi, s'il se peut, en intérêt.

Il s'agit en effet d'interpréter un phénomène qui emprunte toutes les allures d'un processus infectieux en renonçant, une fois pour toutes, à la notion commode et familière mais devenue dorénavant insoutenable d'un ultravirus parasite. Ainsi que nous l'avons fait ressortir à maintes reprises, aucune des tentatives faites dans ce sens ne donne satisfaction à l'esprit. Aussi avons-nous été amenés à proposer une hypothèse nouvelle qu'on peut appeler *hypothèse des facteurs héréditaires* et d'après laquelle la *bactériophagie est un phénomène de variation bactérienne, variation dont les bactériophages seraient les supports matériels ou facteurs héréditaires*.

Cette hypothèse, dont on trouvera l'exposé détaillé dans les

(1) Presque toutes les recherches relatées dans ce travail ont été exécutées à l'Institut « Sanitas » de Santiago du Chili dont pendant trois ans l'un de nous avait assumé la direction scientifique. Nous désirons remercier sincèrement la direction de cet Institut et tout particulièrement un de ses membres, notre ami le Dr Ed. Cruz Coke, professeur de chimie biologique à l'Université, d'avoir pu poursuivre sans interruption et dans les meilleures conditions possibles des travaux personnels.

(2) Ces *Annales*, 39, 1925, p. 739 ; 41, 1927, p. 883 ; 43, 1929, p. 359 ; *Bull. Inst. Pasteur*, 26, 1928, p. 1.

travaux cités ci-dessus, nous paraît rendre compte de façon fort satisfaisante des principales manifestations de la bactériophagie et des propriétés si remarquables des éléments actifs. Elle paraît pouvoir s'étendre à d'autres processus [tumeurs filtrables, maladies dites *mosaïques* des plantes, peut-être, aussi, à d'autres manifestations pathologiques attribuées jusqu'ici à l'action des virus filtrables] (1). L'avenir dira à quel degré elle traduit la signification vraie du phénomène de la bactériophagie et si elle est susceptible d'être appliquée aux autres processus que nous venons d'énumérer et dont la nature demeure complètement inconnue.

Ce qui est certain, c'est que nous nous trouvons devant un ensemble de faits du plus haut intérêt et que les notions courantes sont impuissantes à expliquer. Pour nous en tenir au cas de la bactériophagie qui seul doit nous occuper ici, la carence de la théorie parasitaire laisse le champ libre à l'interprétation de ce phénomène. Seule, en effet, parmi les notions classiques, la théorie parasitaire paraissait fournir une explication, ou mieux, une image adéquate des faits. Cette théorie devenue caduque, il faut bien chercher l'interprétation de ces faits si complètement nouveaux dans des voies nouvelles, fussent celles-ci paraître révolutionnaires. C'est dans ce sens que nous disions plus haut que le problème a gagné en intérêt depuis que la théorie parasitaire a pu être définitivement écartée. Quelle sera la voie qui mènera au but? On ne peut guère le prévoir et « l'essentiel est », pour le moment, comme le disent Bordet et Renaux, « d'amonceler sans relâche les données expérimentales » (2). S'imbriquant les unes avec les autres, s'adaptant mutuellement, ces données expérimentales finiront bien par imposer son caractère définitif au futur édifice dont nous cherchons à entrevoir la forme et le plan général.

Nous nous proposons, dans ce travail, d'exposer les recherches que nous avons poursuivies depuis la publication de notre dernier mémoire. Nous en confronterons ensuite brièvement les résultats, ainsi que d'autres faits acquis pendant ce laps de temps avec la *théorie des facteurs héréditaires*.

(1) Voir notamment *Bull. Inst. Pasteur*, 26, 1928, p. 1.

(2) Ces *Annales*, 42, 1928, p. 1283.

I. — Bactériophagie spontanée et expérimentale.

Variations bactériennes.

Action oligodynamique de l'argent
sur les bactéries et les bactériophages.

Ainsi qu'on l'a souvent répété et qu'on le comprend aisément, de toutes les objections faites à la théorie parasitaire de la bactériophagie, la plus importante est celle qui vise l'apparition spontanée ou provoquée de ce phénomène dans des cultures bactériennes en apparence normales.

Nous nous sommes longuement occupés de cette question importante dans deux mémoires précédents et nous ne ferons que rappeler ici la conclusion à laquelle nous avons abouti : « Les facteurs auxquels on avait pu attribuer la production de la bactériophagie ne jouent vraisemblablement, dans le déclenchement de ce phénomène, qu'un rôle tout à fait secondaire et accidentel. Le déterminisme vrai de la bactériophagie nous échappe pour le moment totalement. »

En admettant donc que dans ces recherches toutes les causes d'erreur eussent été éliminées, c'est-à-dire que les techniques mises en œuvre ne comportent pas l'introduction de bactériophages préexistants (1), les cas de bactériophagie expérimentale ou provoquée décrits au moment de la publication de nos deux premiers mémoires nous paraissent devoir être ramenés à des cas de bactériophagie spontanée.

Les recherches que nous avons instituées depuis cette publication en vue de reproduire les résultats annoncés dans quelques travaux récents ne sont pas de nature à modifier cette conclusion.

Nous avons, en effet, répété les expériences de Béguet (*Arch. Inst. Pasteur d'Algérie*, 5, 1927, p. 25), ainsi que celles de Plantureux (*C. R. Acad. Sc.*, 190, 1930, p. 223 et *C. R. Soc. Biol.*, 103, 1930, p. 387) en nous plaçant aussi exactement que

(1) C'était certainement le cas dans la prétendue production de bactériophages sous l'action de ferments protéolytiques. Les protéases d'insectes aseptiques se sont en effet montrées, dans nos expériences, incapables de déclencher la bactériophagie.

possible dans les conditions indiquées par ces chercheurs. Nos expériences ont porté sur un *B. Shiga*, pour la technique de Béguet, sur le même *Shiga* et un staphylocoque blanc pour la technique de Plantureux. Ces deux souches utilisées depuis des années dans nos recherches sur la bactériophagie sont extrêmement sensibles à l'action des bactériophages correspondants et n'ont jamais présenté le moindre signe de bactériophagie spontanée. Les expériences ont été répétées plusieurs fois et poursuivies pendant de nombreux mois. Il nous fut malheureusement impossible de déclencher la bactériophagie ni par la technique de Béguet en parlant des colonies-filles où, d'après cet auteur, il se produirait une modification des colloïdes bactériens par changement de la pression osmotique, ni par celle de Plantureux qui attribue cette modification au changement de signe électrique qu'il cherche à obtenir soit par l'action de l'ion OH, soit par celle des cations polyvalents (Ca^{++} , Ba^{++} , Mg^{++}).

Sans vouloir nier d'aucune façon la possibilité de déclencher la bactériophagie expérimentalement, nous croyons donc que jusqu'ici cette possibilité n'a pas été établie et nous ne nous occuperons ici que de bactériophagie spontanée.

Ce phénomène de bactériophagie spontanée a été signalé comme on le sait, à diverses reprises, avec des cultures qui jusqu'à un moment donné n'avaient rien présenté d'anormal. Or, à moins d'admettre une génération spontanée de virus bactériophage, un seul cas *bien établi* de bactériophagie spontanée suffisait à écarter définitivement l'hypothèse parasitaire. Malheureusement, la question est restée jusqu'ici en litige.

Se basant sur des faits indiscutables (nous en avons nous-mêmes rapporté des exemples) où la présence de bactériophages peut ne se manifester qu'après de nombreux passages au cours desquels les cultures se comportent de façon tout à fait normale, d'Hérelle a soutenu que tous les cas de soi-disant bactériophagie spontanée se ramènent, en réalité, à des cas de bactériophagie latente. Pour d'Hérelle, les cultures dans lesquelles on voit, à un moment donné, apparaître le phénomène de la lyse transmissible sont des cultures mixtes bactéries-bactériophages. Il s'était réalisé, dans ces cultures, un certain état d'équilibre, soit par suite de la résistance acquise par les bactéries, soit par

suite de l'affaiblissement des bactériophages : que cet état d'équilibre vienne à être rompu et nous aurons toutes les apparences de la bactériophagie spontanée.

Pour affirmer qu'on a affaire à celle-ci, il faudrait donc être sûr que les cultures utilisées étaient auparavant complètement exemptes de principe actif en les soumettant à un traitement qui détruisît celui-ci sans tuer les bactéries. Ce desideratum paraissait fort difficile sinon impossible à réaliser tant qu'on ne connaissait que la bactériophagie de bactéries asporulées, car le principe actif se montrait dans tous ces cas plus résistant aux agents physiques et chimiques que les germes sensibles. Les choses changent avec la découverte des bactériophages de bactéries sporulées (Koser, Adant). La résistance de ces bactériophages à la chaleur (trente minutes à 70°) était la même que celle des bactériophages des bactéries asporulées et très inférieure, par conséquent, à celles des germes sensibles. On pouvait donc, le plus facilement du monde, obtenir, pour ces germes sporulés, des races « ultra-pures ».

Depuis longtemps, nous désirions entreprendre des expériences dans cet ordre d'idées sur les bactériophages de bactéries sporulées et nous avons prié le professeur Bruynoghe de nous envoyer les souches sensibles et le principe actif isolés dans son laboratoire de Louvain par Adant.

Les cultures de *B. subtilis* et de *B. mesentericus* ainsi que les bactériophages correspondants nous furent envoyés au début de 1929, peu de temps avant notre départ pour le Chili (1). Les expériences que nous allons relater furent commencées au mois de septembre de la même année.

A vrai dire, nous abordions ce travail sans grande conviction.

Les données qu'on possédait sur la bactériophagie spontanée montraient que ce phénomène, si tant est qu'il existait, devait être d'un déterminisme fort difficile à saisir et, par conséquent, fort capricieux et fort irrégulier, en apparence tout au moins. Or, pour atteindre le but que nous nous proposons, il s'agissait non seulement de surprendre la bactériophagie spontanée chez les souches sporulées dont nous disposions, mais

(1) Nous nous faisons un devoir d'adresser ici une fois de plus tous nos remerciements à MM. Bruynoghe et Adant.

aussi et surtout de la voir reparaitre ensuite chez ces mêmes souches après que celles-ci eussent été portées à une température incompatible avec la survie des bactériophages qui s'y fussent trouvés présents antérieurement. Nous avons d'autant moins l'espoir de voir se réaliser ces différentes éventualités que, personnellement, nous n'avions jamais eu l'occasion, au cours de dix ans de recherches sur la bactériophagie, d'observer un seul cas avéré d'apparition spontanée de bactériophages. Quoi qu'il en fût, étant donnée l'importance de la ques-

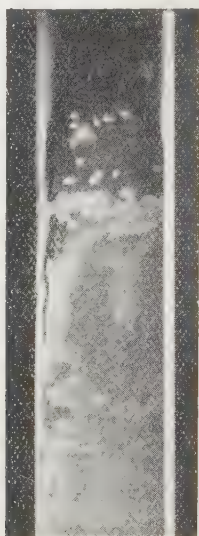


FIG. 1. — *B. subtilis*, « variété muqueuse ».

tion, les recherches valaient la peine d'être tentées. Ainsi qu'on va le voir, elles nous ont permis de faire quelques constatations intéressantes.

En faisant des passages répétés de *B. subtilis* sur gélose inclinée, on voyait apparaître, dans certains tubes, une variété particulière de ce germe qu'on peut appeler variété *muqueuse*. Il se forme, en un point de la surfaceensemencée, une trainée de substance visqueuse, transparente (fig. 1). Réensemencée sur milieu neuf, cette substance muqueuse fournit des colonies dont une partie reproduit l'aspect caractéristique du *B. subtilis* et forme un voile sec, plissé, alors que les autres conservent

l'aspect de la *variété muqueuse* qui vient d'être décrite. En faisant des passages répétés de colonies présentant cet aspect, on parvient à stabiliser la variété en question et à obtenir des cultures qui se présentent sous l'aspect d'enduit visqueux, transparent, filant lorsqu'on en prélève avec l'anse de platine, et dans lesquelles il paraît impossible de reconnaître la souche d'origine. De même, en milieu liquide (bouillon), cette *variété muqueuse* donne des cultures homogènes ou qui s'agglomèrent en flocons et complètement différentes des cultures en voile de la forme-mère. Microscopiquement, à la gangue muqueuse près, les germes des deux variétés ne présentent aucune différence et leur sensibilité au bactériophage anti-*subtilis* est la même.

C'est avec cette variété *muqueuse* de *B. subtilis* que nous avons observé les premiers cas de bactériophagie de toute apparence spontanée qu'il nous ait été donné de voir depuis que nous nous occupons de ce problème.

Une première fois, le phénomène a été observé dans les conditions suivantes. Au cours de passages par bouillon que nous faisons faire tant à la forme d'origine qu'à sa variété *muqueuse*, le tubeensemencé avec cette dernière est resté à un moment donné stérile. L'examen du bouillon resté clair montrait qu'il contenait du bactériophage anti-*subtilis* actif non seulement pour la forme muqueuse qui lui a donné naissance, mais aussi pour la forme d'origine.

Une autre fois, une culture de *subtilis* muqueux sur gélose inclinée présenta à l'examen fait au bout de quelques jours des plages fort nettes. L'étude du phénomène montra clairement qu'ici encore il s'agissait de lyse bactériophagique.

Nous nous sommes aussitôt mis en devoir de reproduire les faits que nous venons de décrire avec des cultures *chauffées*. Des suspensions de *subtilis* muqueux étaient portées à 100° pendant cinq minutes ou à 85° pendant quinze minutes. Avec les cultures obtenues à partir de ces suspensions chauffées, nous avons fait, à plusieurs reprises, des séries de passages (jusqu'à 15 passages par série) sur milieux solide et liquide dans l'espoir de voir se reproduire le phénomène de bactériophagie que nous avons observé avec les cultures non chauffées. Les résultats furent constamment négatifs.

Non seulement le but que nous nous propositions n'était donc

pas atteint, mais nos résultats semblaient plutôt confirmer les vues de d'Hérelle d'après lesquelles la bactériophagie qui se manifeste dans des cultures jusque-là en apparence « ultra-pures » est due, en réalité, à la présence de bactériophages préexistants. Si, personnellement, nous étions persuadés que nos résultats s'expliquaient plutôt par le déterminisme complexe et encore ignoré de la bactériophagie spontanée, rien ne le démontrait et rien ne permettait de rejeter l'interprétation proposée par d'Hérelle.

Fort heureusement les recherches de L. E. den Dooren de Jong publiées tout récemment complètent les nôtres et semblent permettre de trancher la question de façon définitive.

En étudiant le *B. megatherium*, ce chercheur constata que les colonies secondaires (ou colonies-filles) qui apparaissent dans les cultures de ce bacille sporulé sont constituées par une variété asporogène. Avec le temps ces colonies-filles subissent une espèce de lyse et il reste à leur place, dans la colonie mère, des « trous » plus ou moins profonds. En faisant des passages de *B. megatherium* sur gélose avec une forte teneur en peptone (3 à 10 p. 100), on obtient des cultures constituées par la variété asporogène. Comme les colonies-filles de tout à l'heure ces cultures semblent être le siège d'une action lytique : elles deviennent transparentes et meurent en dix-quatorze jours. Fait intéressant, les colonies de la variété asporogène ou « mutilat » (d'après la terminologie de v. Loghem) obtenues à partir de cultures précédemment pasteurisées présentaient les mêmes particularités. Il fut toutefois impossible de déclencher la lyse avec le filtrat de telles cultures.

Poursuivant l'étude de ses « mutilats », den Dooren constate qu'une des souches, le n° 899, présentait, à côté de colonies, normales, des colonies de forme irrégulière (Flatterformen). Le filtrat de cultures contenant de telles colonies, inactif pour les diverses souches dont disposait l'auteur, s'est montré lytique pour une seule : « mutilat » de la souche n° 337. Non seulement cette lyse était-elle indéfiniment transmissible en série,

(1) *Proc. Kon. acad. v. Wetensch.*, **33**, 1930, *Zentralbl. f. Bakt.*, **120**, p. 1 et 15, 1931; *Zentralbl. f. Bakt.*, **122**, p. 277, 1931.

mais son agent présentait une nature corpusculaire ainsi qu'il résulte de la présence de plages bien caractérisées dans les cultures sur gélose inclinée. Le phénomène présentait donc tous les caractères de la bactériophagie, le principe actif étant détruit par chauffage à 70° pendant cinq minutes. Or, et c'est là le fait important, le phénomène a pu être reproduit avec des cultures du « mutilat » 899 préalablement chauffées en ampoules scellées à 100° pendant cinq minutes.

De nouvelles recherches montrèrent que les « mutilats » de souches auparavant insensibles à l'action du bactériophage de la souche 899 pouvaient devenir sensibles par culture sur milieux peptonés à 10 p. 100. Pour que la bactériophagie se manifeste, il faut donc que le principe actif se trouve en présence de variétés appropriées du germe sensible.

Enfin, tout récemment, den Dooren étend ses recherches à un autre bacille sporulé du sol : *Bac. undulatus* n. spec. Ici il ne se produit pas de colonies de forme irrégulière (Flatterformen). Rien n'attire donc l'attention du chercheur et l'auteur a dû étudier un grand nombre de souches (30) et rechercher l'action des filtrats obtenus à partir de chacune sur les « mutilats » de ces trente souches. L'étude des diverses *combinaisons* montra que certains de ces filtrats mis en présence de certains « mutilats » donnaient lieu, sur gélose inclinée, à l'apparition de *plages*. Une étude approfondie établit que les principes actifs étaient identiques aux bactériophages; Ils étaient détruits par un chauffage de dix minutes à 75°. Or, ces principes actifs purent, ici encore, être obtenus à partir de cultures portées à 100° en ampoules scellées pendant cinq à vingt minutes.

Nous nous sommes un peu étendus sur ces expériences de den Dooren car elles constituent, à notre sens, un des apports expérimentaux les plus importants au problème de la bactériophagie. Toute possibilité d'infection latente par des bactériophages y semble exclue et l'on se trouve, pour la première fois, devant des cas de bactériophagie spontanée établis sans doute possible.

Instituées en même temps que les nôtres et dans le même but, ces expériences constituent la condamnation définitive de l'hypothèse parasitaire rendue peu vraisemblable déjà par l'en-

semble des données que l'on possédait, mais autour de laquelle les discussions menaçaient de s'éterniser.

Nous savons dorénavant que les bactériophages ne sont pas des virus filtrables parasites des bactéries. Que sont-ils? Seule une connaissance de plus en plus approfondie de leurs propriétés, des modifications qu'ils impriment aux bactéries, nous permettra de répondre un jour à cette question. A ce titre aucun apport n'est négligeable et nous allons rapporter les faits que nous avons pu nous-mêmes réunir au cours des deux dernières années.

Nous allons commencer par décrire un cas intéressant de « dissociation » microbienne chez le *B. subtilis* sous l'action du bactériophage correspondant.

Lorsqu'on ajoute une trace de bactériophage à une suspension de *B. subtilis* et qu'on ensemence aussitôt sur gélose inclinée on voit apparaître à côté des colonies chevelues du *subtilis* d'origine fortement adhérentes à la gélose dont on ne les détache qu'avec difficulté des colonies d'aspect fort différent : colonies régulièrement arrondies, translucides, de structure granuleuse, légèrement ombiliquées, sans adhérence avec le milieu sur la surface duquel on les fait glisser d'une seule pièce (fig. 2). Il y a là, évidemment, un nouvel exemple de *dissociation* en formes « R » et « S » des auteurs de langue anglaise, mais où les différences d'aspect entre les colonies des deux types sont telles qu'on éprouve de la difficulté à admettre qu'il s'agisse d'un seul et même germe (1). Pourtant aussi bien pour la morphologie que pour la sensibilité vis-à-vis du bactériophage anti-*subtilis*, les germes constituant les deux types de colonies se montrent identiques.

2° Ayant eu à nous occuper de l'action dite *oligodynamique* de l'argent sur certaines bactéries (2), il nous a paru intéressant d'étendre ces recherches aux bactériophages correspondants (anti-*typhique*, anti-*Shiga*, anti-*staphylocoque*).

De façon générale, tous les bactériophages étudiés se sont montrés beaucoup plus résistants à l'action de l'Ag. que les bactéries (stérilisation complète, dans les conditions de nos

(1) Des formes analogues ont été observées par Soule au cours de la dissociation spontanée du *B. subtilis*. *Journ. Inf. Dis.*, **13**, 1928.

(2) Soc. Biol. de Santiago, in *C. R. Soc. Biol.*, **108**, p. 111, 1931.

expériences, en une à six heures); mais cette résistance varie beaucoup d'un bactériophage à l'autre.

C'est ainsi que le bactériophage antityphique étudié s'est montré le plus immédiatement sensible en ce sens qu'une partie des éléments actifs se trouve assez rapidement atteinte.

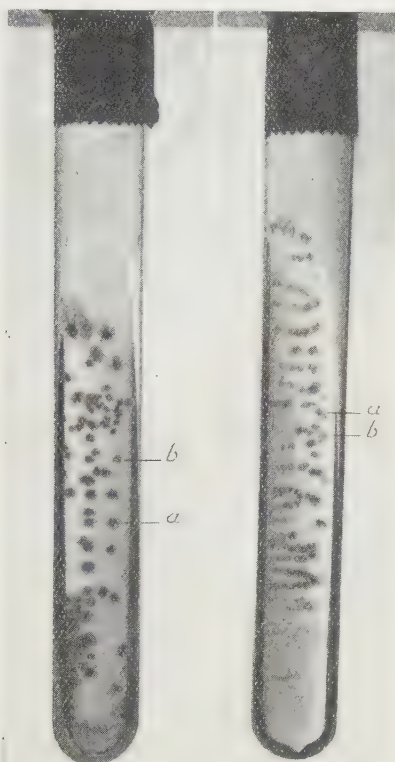


FIG. 2. — *B. subtilis*, colonies de variétés « chevelue » *a* et « lisse » *b*.

Déjà au bout de vingt-quatre heures de traitement par l'argent l'action lytique de ce bactériophage (mesurée par le nombre de plages produites sur gélose inclinée) diminue de moitié. [Il est intéressant de rappeler que le traitement par la trypsine avait décelé, chez un bactériophage anti-Shiga, une hétérogénéité analogue (1)].

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 90, 19 janvier 1927, p. 59.

Les bactériophages anti-*Shiga* et antistaphylococcique étudiés ne présentent pas, après vingt-quatre heures de traitement par l'argent, de diminution appréciable d'activité. Plus tard, au bout de quatre-vingt-seize heures, le bactériophage antityphique a encore perdu de son activité, mais celle-ci ayant atteint un certain *minimum* paraît rester constante (une centaine de plages dans les conditions de l'expérience) pendant un temps assez long.

Par contre, les bactériophages anti-*Shiga* et antistaphylocoque qui ne sont pas sensiblement atteints après vingt-quatre heures d'exposition à l'action de l'argent ont perdu toute activité après une exposition plus longue (quatre-vingt-seize heures). Dans le cas du bactériophage antistaphylococcique, cette inactivation est définitive et l'on ne parvient pas, par passages sur le staphylocoque sensible, à lui faire récupérer son action lytique.

II. — Recherches sur la nature chimique des bactériophages.

Les bactériophages sont doués de fonctions antigènes complètes et sont par conséquent, de nature protéique. Pourtant, certaines particularités de ces fonctions antigènes font penser que des lipoides pourraient peut-être entrer dans la constitution de ces principes. On sait, en effet, que l'immense majorité, on peut dire la presque totalité des antigènes protéiques, sont caractérisés par une *spécificité* au sens propre du mot, c'est-à-dire qui est attribut de l'espèce. Il en est autrement des antigènes lipoides dont la spécificité peut être qualifiée de groupe ou de type. Il suffira de rappeler le cas des antigènes dits hétérogénétiques, ainsi que les particularités de la réaction de Wassermann qui ont si longtemps dérouté les chercheurs et qui s'expliquent probablement, en partie au moins, par la nature lipide des éléments en jeu.

Quelque chose d'analogue se présente pour les bactériophages. Alors qu'un sérum antityphique, par exemple, ne présente d'affinité très prononcée que pour le bacille homologue (à un degré beaucoup plus faible pour son plus proche parent, le *paratyphique A*), un sérum préparé avec un bactériophage anti-

typhique se comporte tout autrement. Un sérum préparé avec un bactériophage antityphique, par exemple, n'ayant fait, depuis des années, de passages que par le bacille d'Eberth, neutralise non seulement le bactériophage homologue, mais aussi un bactériophage anti-*Shiga* n'ayant, lui, depuis des années, fait des passages que par le bacille de *Shiga*.

Les rapports qui existent entre les bactériophages et leurs anticorps sont encore, à la vérité, fort obscurs. Pour Otto et ses collaborateurs (1), la fonction antigène d'un bactériophage est sous la dépendance de sa « virulence ». Un sérum anti-bactériophage Flexner, par exemple, neutraliserait la virulence pour le bacille de Flexner de tous les bactériophages actifs pour ce germe et laisserait intacte l'action, la « virulence », de ces bactériophages pour les autres bacilles qui y sont sensibles. Pour Bruynoghe et ses collaborateurs (2), le pouvoir antigène des bactériophages est fonction de leur origine : un sérum préparé avec un bactériophage antityphique donné neutraliserait celui-ci et laisserait intacts d'autres bactériophages antityphiques. Il est possible que ces rapports entre bactériophages et anticorps diffèrent d'un cas à l'autre ; quoi qu'il en soit nos expériences sont en désaccord avec l'une et l'autre façon de voir. Dans l'exemple que nous avons rappelé plus haut, le sérum préparé avec un bactériophage antityphique neutralisait non seulement le bactériophage homologue, mais aussi un bactériophage anti-*Shiga*. Fait important, la neutralisation portait non seulement sur les « virulences » communes aux deux bactériophages (pour le *B. typhique* et le bacille de *Shiga*), mais aussi sur les « virulences » du bactériophage anti-*Shiga* pour les bacilles dysentériques Y et Flexner vis-à-vis desquels le bactériophage antityphique employé pour la préparation du sérum était complètement inactif (3).

Si donc la nature exacte de la spécificité antigénique des bactériophages nous échappe pour le moment ses manifestations rappellent à certains points de vue les phénomènes de *groupe* ou de *type* qui caractérisent les antigènes lipoides.

D'autre part, les lipoides jouent un rôle important dans

(1) *Zeitschr. f. Hyg.*, **96**, 1922, p. 118.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, **87**, 1922, p. 93.

(3) *C. R. Soc. Biol.*, **96**, 1927, p. 332.

divers phénomènes lytiques (bactériolyse, hémolyse). Il suffit de rappeler l'action lytique directe de certains lipoides (action de la lécithine sur le *B. typhique* — Bassenge; action de la bile et des sels d'acides biliaires sur les pneumocoques) et le rôle qui paraît leur incomber dans l'action de la pyocyanase, ainsi que dans la lyse alexique. La lyse étant une des manifestations les plus frappantes de la bactériophagie, il y avait là une analogie de plus pouvant faire penser que les lipoides intervenaient dans la constitution des bactériophages. Il nous avait donc paru intéressant d'entreprendre des recherches dans cet ordre d'idées.

Deux méthodes pouvaient être envisagées pour aborder ce problème. Une première, chimique, qui consisterait à doser les lipoides dans des suspensions bactériennes lysées par les bactériophages et à comparer les résultats avec ceux fournis par des suspensions bactériennes témoins, d'une égale richesse en éléments bactériens. Mais outre que les deux lots pouvaient ne différer que par la répartition et non par la quantité ou la qualité de lipoides les différences de cet ordre, si elles existent, doivent forcément être très faibles. Il nous était difficile d'entreprendre de telles recherches dans les conditions où nous nous trouvions et nous nous réservons d'y revenir prochainement. Nous nous sommes donc servis d'une méthode biologique qui consiste à extraire les lipoides des suspensions bactériennes lysées par des bactériophages et à rechercher si les sérums préparés avec ces lipoides neutralisent les bactériophages correspondants; ou, encore, si les anticorps des sérums anti-bactériophages peuvent être neutralisés par les lipoides extraits de ceux-ci.

Nous allons rapporter la marche et les résultats de deux séries d'expériences portant l'une et l'autre sur un bactériophage antistaphylococcique et un bactériophage antityphique. Dans la première série, l'extraction des lipoides a été faite par l'alcool; dans la deuxième, par l'acétone. (Dans une expérience préliminaire, cette extraction avait été pratiquée par l'alcool et par l'éther qu'on faisait agir sur du bactériophage desséché par mélange déshydratant.)

3 ballons contenant chacun 1 litre de bouillon sontensemencés avec un staphylocoque blanc. Après plusieurs heures d'étuve, on ajoute une petite

quantité de bactériophage antistaphylococcique et on laisse à l'étuve jusqu'au lendemain : lyse complète.

Le lysat est versé dans des cuvettes en porcelaine contenant de la terre d'infusoires et desséché à la température de 37° en cinq ou six jours. Le contenu des cuvettes est alors trituré et versé, par parties égales, dans 2 ballons, une partie devant être traitée par l'alcool et l'autre par l'acétone.

La première partie est traitée par 2 litres d'alcool à l'étuve; on agite plusieurs fois par jour. On décante après six jours, on remplace l'alcool décanté par 1 litre d'alcool frais qu'on laisse en contact dans les mêmes conditions pendant sept jours. Cette seconde portion est décantée et remplacée par 1 litre d'alcool frais qu'on laisse en contact, en agitant tous les jours, pendant six nouveaux jours.

On réunit les diverses portions, on filtre sur papier et l'on fait évaporer l'alcool dans le vide à 49°. Le résidu obtenu est redissous dans de l'alcool, cette solution est filtrée sur papier et additionnée de 225 cent. cubes d'eau distillée. L'alcool est ensuite séparé par distillation dans le vide au bain-marie à 45° jusqu'à réduction du volume à 225 cent. cubes. On obtient ainsi une première émulsion de lipoides (I) solubles dans l'alcool.

La seconde partie du bactériophage desséché sur terre d'infusoires est traitée de la même façon par l'acétone. On obtient ainsi une émulsion (II) de lipoides solubles dans l'acétone.

Au cours d'expériences préliminaires, nous avons essayé, sans succès, d'obtenir des sérums antibactériophages en préparant des lapins avec les lipoides extraits, soit seuls, soit combinés à des vecteurs protéiques. Dans les expériences actuelles, on s'est borné à rechercher si les lipoides extraits des lysats bactériophagiques fixaient les anticorps pour les bactériophages correspondants.

EXPÉRIENCES. — 24 avril 1930 : Un sérum antibactériophage staphylococcique (n° 94) qui neutralise le bactériophage correspondant dans les proportions de 3 volumes de sérum pour 1 volume de bactériophage est mis en présence de lipoides extraits par l'alcool de lysat bactériophagique de staphylocoque dans les proportions suivantes :

a) X gouttes d'émulsion de lipoides + X gouttes de sérum 94 ;

b) V gouttes d'émulsion de lipoides + XV gouttes de sérum 94.

On fait, de plus, les témoins suivants :

c) X gouttes d'émulsion de lipoides + X gouttes de sérum normal.

d) X gouttes d'émulsion de lipoides + X gouttes de sérum antibactériophage Shiga.

Après deux jours d'étuve et six jours de chambre, on ajoute :

1 2 mai : Au tube b) V gouttes de bactériophage antistaphylococcique.

Au tube d) X gouttes de bactériophage anti-Shiga.

On laisse au laboratoire jusqu'au 8 mai et l'on prépare, en même temps, les tubes témoins suivants :

3 mai : a) V gouttes de bouillon + XV gouttes de sérum 94 + V gouttes de bactériophage antistaphylococcique ;

b') XV gouttes de sérum 94 + V gouttes de bactériophage antistaphylococcique;

c') XV gouttes de sérum 94 + XIII gouttes de bactériophage antistaphylococcique.

8 mai : on prépare les mélanges suivants :

a') XVI gouttes d'une suspension de staphylocoque + IV gouttes a ;

d') XIV gouttes d'une suspension de *B. Shiga* + VI gouttes d ;

b') XVI gouttes d'une suspension de *staphylocoque* + IV gouttes b ;

b₁') XVII gouttes d'une suspension de *staphylocoque* + III gouttes b₁' ;

b₂') XVIII gouttes d'une suspension de *staphylocoque* + II gouttes c₁'.

Il ne se produit aucune lyse dans les tubes ainsi préparés.

9 mai : L'expérience est répétée dans les conditions suivantes :

a) XVIII gouttes de lipoides + VI gouttes de sérum 94 ;

b) XXXVI gouttes de lipoides + VI gouttes de sérum 94 ;

c) XLII gouttes de lipoides + VI gouttes de sérum 94.

Étuve jusqu'au 11 mai.

11 mai : On ajoute VI gouttes de bactériophage antistaphylococcique à chacun de ces 3 tubes et on reporte à l'étuve.

14 mai : On fait les mélanges suivants :

a') XV gouttes suspension de staphylocoque + V gouttes a).

b') XV gouttes suspension de staphylocoque + IX gouttes b).

c') XV gouttes suspension de staphylocoque + VIII gouttes c).

On ensemence en nappe, sur gélose inclinée, le contenu de chacun de ces tubes. Les cultures se développent de façon absolument normale.

Donc, les lipoides extraits par l'alcool des lysats bactériophagiques de *staphylocoque*, mis en présence de sérum antibactériophage *staphylococcique*, n'affectent pas son pouvoir neutralisant pour le bactériophage correspondant. En d'autres termes, ces lipoides ne fixent pas les anticorps de ce sérum pour son bactériophage.

Des résultats négatifs de même ordre ont été obtenus avec des lipoides extraits des lysats bactériophagiques de *staphylocoque*, par l'acétone.

EXPÉRIENCE. — 5 mai : a) X gouttes suspension lipoides (II) + X gouttes sérum 94 ;

b) V gouttes suspension lipoides (II) + XV gouttes sérum 94 ;

c) X gouttes bouillon lipoïde + X gouttes (témoin).

9 mai : On ajoute III gouttes de bactériophage-staphylocoque au tube a)

On ajoute V gouttes de bactériophage-staphylocoque au tube b).

On ajoute VI gouttes de bactériophage-staphylocoque au tube c).

12 mai : a') IV gouttes suspension-staphylocoque + VI gouttes a).

b') VI gouttes suspension-staphylocoque + V gouttes b).

c') VI gouttes suspension-staphylocoque + IV gouttes c) [témoin].

Des ensemencements en nappe faits avec le contenu de chacun de ces 3 tubes montrent que le pouvoir neutralisant du sérum antibactériophage *staphylococcique* n'a été en rien affecté par l'action des lipoides extraits par l'acétone.

Au cours de ces expériences, nous avons obtenu un sérum n° 25 antibactériophage staphylococcique particulièrement actif : neutralisation complète du bactériophage correspondant dans les proportions d'une partie de sérum pour 600 parties de bactériophage, neutralisation partielle à 1 p. 1.000.

L'expérience a été reprise avec ce sérum. Afin d'éliminer l'objection d'après laquelle l'émulsion de lipoides se serait trouvée en présence d'un excès d'anticorps masquant une absorption partielle de ceux-ci le sérum a été employé à la dilution de 1 p. 100.

EXPÉRIENCE. — 27 juin : a) XVIII gouttes lipoides (II) + III gouttes sérum 25 à 1 p. 100.

b) XXIV gouttes lipoides (II) + III gouttes sérum 25 à 1 p. 100.

c) XXX gouttes lipoides (II) + III gouttes sérum 25 à 1 p. 100.

d) XVIII gouttes d'eau physiologique + III gouttes sérum (témoin).

e) XXIV gouttes d'eau physiologique + III gouttes sérum (témoin).

30 juin : on ajoute a') II gouttes bactériophage à a).

On ajoute b') I goutte V bactériophage à b).

On ajoute c') I goutte bactériophage à c).

On ajoute d') II gouttes bactériophage à d).

On ajoute e') II gouttes bactériophage à e).

On met les tubes à l'étuve à 37° pendant vingt-quatre heures après quoi ils sont gardés à la température du laboratoire jusqu'au 4 juillet.

4 juillet : on ajoute quelques gouttes de suspension de staphylocoque à chacun des tubes et l'on ensemence en nappe sur gélose inclinée. Voici les résultats :

5 juillet : a') une quinzaine de plages.

b') Pas de plages.

c') Pas de plages.

d') Pas de plages; témoin.

e') Une dizaine de plages; témoins.

Donc ici encore, *absence complète de toute action de lipoides (II) sur la teneur en anticorps du sérum antibactériophage staphylococcique.*

Des expériences analogues ont été faites avec un bactériophage antityphique. Le contenu de 5 ballons de 1 litre de lysat bactériophagique de *B. typhique* est desséché sur terre d'infusoires.

2 mai : le contenu d'une des cuvettes avec de la terre d'infusoires est repris par 750 cent. cubes d'alcool et laissé à l'étuve dans un ballon pendant cinq jours en agitant tous les jours. Le contenu de la deuxième cuvette est repris, dans les mêmes conditions, par 500 cent. cubes d'acétone.

7 mai : on décante le liquide de chacun des deux ballons et on le remplace, respectivement, par 500 cent. cubes d'alcool et d'acétone. On porte de

nouveau à l'étuve. Le ballon contenant l'alcool ayant éclaté l'expérience est poursuivie avec la 2^e portion seule, c'est-à-dire avec les lipoides solubles dans l'acétone.

Nous retrouvons, avec cette expérience, pour les lipoides du lysat bactériophagique du *B. typhique* solubles dans l'acétone, les résultats que nous venons de rapporter pour les lipoides des lysats staphylococciques. *Ces lipoides se montrent inaptes à neutraliser les anticorps contenus dans le sérum antibactériophage correspondant.*

Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent donc pas de rapporter à des constituants lipoides les particularités des fonctions antigènes des bactériophages. Mais en tant que résultats négatifs ils n'autorisent pas à exclure la possibilité que des lipoides entrent dans la constitution de ces principes lytiques. La fonction antigène des bactériophages est, en effet, relativement labile. Ainsi que nous l'avons vu, elle ne subsiste que fortement atténuée à la température d'inactivation des bactériophages. Rien d'étonnant, par conséquent, à ce qu'on ne la retrouve plus après les manipulations employées pour l'extraction et la stérilisation des lipoides.

Mais si nos expériences ne nous permettent pas de répondre à la question que nous nous étions posée et dont nous nous proposons de poursuivre l'étude par d'autres voies nous avons pu, chemin faisant, faire quelques constatations que nous allons rapporter brièvement.

Nous avons pu tout d'abord nous assurer par des expériences parallèles que le traitement des lysats par la terre d'infusoires ou d'autres absorbants, comme le papier-filtre, amène leur adsorption à peu près complète, le liquide surnageant pouvant se montrer dépourvu de toute action lytique. Cette *adsorption* est assez stable et il faut ensuite traiter l'adsorbant pendant un temps plus ou moins long par un liquide neuf (bouillon ou eau physiologique) pour y voir apparaître une action lytique.

D'autre part, la dessiccation des lysats sur les substances adsorbantes (terre d'infusoires ou papier-filtre) n'amène pas leur destruction, ainsi qu'on peut s'en convaincre par la récupération dont il vient d'être question.

Enfin, fait curieux, étant donnée la résistance des bactériophages à la plupart des facteurs physiques et chimiques, le

bactériophage typhique s'est montré assez sensible à l'action des lipoides homologues extraits par l'acétone, alors que ces lipoides n'exercent qu'une action bactéricide faible pour le *B. typhique* et sont dépourvus d'action pour le bactériophage antistaphylococcique.

EXPÉRIENCE. — 9 juillet : On fait les mélanges suivants :

a) XXXVI gouttes lipoides de bactériophage typhique (acétone). + IV gouttes de bactériophage typhique.

b) XXIV gouttes lipoides de bactériophage typhique (acétone), + IV gouttes de bactériophage typhique, + XII gouttes de sérum normal.

c) XXIV gouttes lipoides de bactériophage typhique (acétone), + XII gouttes de sérum normal.

16 juillet : On ajoute IV gouttes de bactériophage antityphique au tube c) ; en même temps, on prélève II gouttes de chacun des 3 tubes, et on les ajoute à XVIII gouttes de suspension de *B. typhique*.

a') XVIII gouttes de suspension de *B. typhique*, + II gouttes a).

b') XVIII gouttes de suspension de *B. typhique*, + II gouttes b).

c') XVIII gouttes de suspension de *B. typhique*, + II gouttes c).

On ensemence en nappe sur gélose inclinée. Le lendemain, on constate qu'il n'y a pas de lyse dans les tubes correspondant à a) et b), alors que la lyse est très prononcée dans le tube correspondant à c). Le bactériophage antityphique a donc été inactivé (peut-être par adsorption) après sept jours de contact avec les lipoides homologues extraits par l'acétone.

De tels faits en dehors de leur intérêt propre sont importants à connaître, car les résultats d'expériences de neutralisation des sérums par les lipoides peuvent s'en trouver masqués.

BACTÉRIOPHAGES ET ANTICORPS.

Il est actuellement bien établi qu'en tant qu'antigènes les bactériophages représentent des entités nouvelles ne préexistant pas chez les bactéries normales. Nous avons insisté à diverses reprises (1) sur cette *autonomie antigène* des bactériophages, car c'est un fait de la plus haute importance pour l'idée qu'on peut se faire de la nature de ces éléments.

En effet, cette *autonomie antigène* est non seulement parfaitement compatible avec l'hypothèse parasitaire, mais en constitue, en quelque sorte, un corollaire nécessaire. Elle semble, par contre, assez difficilement compatible avec l'origine bactérienne des bactériophages et exclue de toute évidence l'idée

(1) C. R. Soc. Biol., 75, 1921, p. 772 ; *Ibid.*, 92, 1925, p. 1284, *Ces Annales*, 39, 1925.

d'après laquelle il s'agirait de constituants ou de produits de la cellule bactérienne normale.

Quoi qu'il en soit de l'interprétation de cette *autonomie anti-gène* des bactériophages, il y a un intérêt évident à étudier de plus près la façon dont ces éléments se comportent *vis-à-vis* des sérums spécifiques.

D'après Bordet et Ciuca (et nos propres expériences confirmement pleinement les résultats de ces auteurs *contra* d'Hérelle), l'inactivation des bactériophages par les antisérums correspondants est une neutralisation définitive : le complexe bactériophage-sérum n'est pas réactivé par passages sur bactéries sensibles.

Nous nous sommes demandé s'il serait possible de récupérer les principes actifs en soumettant le complexe bactériophage-antisérum à un traitement approprié. Trois séries d'expériences furent faites dans lesquelles on faisait agir respectivement (1) des acides ou des bases ; (2) la digestion tryptique ; (3) la chaleur.

1^o Action des acides et des bases.

On prépare les mélanges suivants :

a) XXX gouttes de sérum anti-bactériophage typhique + X gouttes de bactériophage typhique.

b) XX gouttes de sérum antibactériophage-staphylococcique + XX gouttes de bactériophage staphylococcique.

Quelques jours plus tard, on prélève I goutte de chacun de ces mélanges, et on les met en présence de quantités décroissantes d'acide et de base. Le lendemain, on prélève I goutte de ce nouveau mélange ; on l'ajoute à IX gouttes de suspension de *B. typhique*, ou de *staphylocoque*, respectivement, et l'on ensemence en nappe sur gélose inclinée. Voici, à titre d'exemple, une expérience portant sur le bactériophage anti-staphylococcique.

EXPÉRIENCE. — IX gouttes de suspension de staphylocoque + I goutte (I goutte *b* + XIX gouttes NaOH 1/500).

IX gouttes de suspension de staphylocoque + I goutte (I goutte *b* + XIX gouttes de NaOH 1/600).

IX gouttes de suspension de staphylocoque + I goutte (I goutte *b* + XIX gouttes de NaOH 1/700).

IX gouttes de suspension de staphylocoque + I goutte (I goutte *b* + XIX gouttes de NaOH 1/800).

Témoin : IX gouttes de suspension de staphylocoque + I goutte *b*).

Dans tous les cas, l'ensemencement donne une culture normale, sans plages. Le bactériophage neutralisé par le

sérum antibactériophage n'avait donc pas été mis en liberté.

Des résultats semblables ont été obtenus pour le staphylocoque, avec l'HCl à des concentrations variant de 1/100^e à 1/400^e.

Le *B. typhique* s'étant montré beaucoup plus sensible à l'action des acides, et surtout des alcalis, les résultats furent moins nets, mais ici non plus le complexe bactériophage-sérum anti ne paraissait pas se dissocier sous l'action de l'HCl ou de la NaOH.

2° Action de la trypsine.

A part quelques cas exceptionnels (un bactériophage anti-Shiga signalé par nous en 1927 (1) et un bactériophage antistaphylococcique décrit par Schultz), les bactériophages résistent parfaitement à l'action de la digestion tryptique. Nous nous sommes donc demandé si un bactériophage pouvait être récupéré à partir du complexe bactériophage-sérum anti-bactériophage par l'action de la trypsine. Les expériences suivantes furent instituées.

21 juillet : a) L gouttes sérum antibactériophage staphylococcique à 1/100 + 11 gouttes bactériophage staphylococcique.

b) XV gouttes sérum antibactériophage staphylococcique à 1/100 + XV gouttes bactériophage-staphylococcique.

c) L gouttes sérum antibactériophage staphylococcique à 1/500 + I goutte bactériophage-staphylococcique.

d) XX gouttes sérum antibactériophage staphylococcique à 1/500 + XX gouttes bactériophage staphylococcique.

e) L gouttes eau physiologique + I goutte bactériophage-staphylocoque.

24 juillet : Le contenu de chaque tube est divisé en deux parties, l'une servant de témoin, l'autre recevant 11 gouttes d'une solution active de trypsine. On porte à l'étuve.

29 juillet : On ajoute V gouttes de chacun des tubes ci-dessus à XV gouttes de suspension staphylococcique et on ensemence en nappe sur gélose inclinée. Les cultures sont normales partout excepté dans le tube correspondant au tube e témoin, où la lyse est complète. La digestion tryptique n'a donc pas amené la dissociation du complexe bactériophage + sérum anti. Toutefois, une expérience témoin dans laquelle le sérum antibactériophage seul avait été soumis à l'action préalable de la trypsine montra que le pouvoir neutralisant du sérum n'est nullement affecté par ce traitement : l'anticorps en question semble donc résister à la digestion tryptique.

(1) C. R. Soc. Biol., 90, p. 59.

3° Action de la chaleur.

Les bactériophages présentent une résistance considérable à la chaleur, ceux du groupe *coli-typhique-dysentérique* n'étant détruits qu'entre 70-75° (en une heure). On pouvait donc se demander si les différences des températures de destruction de ces éléments et des anticorps correspondants présenteraient une marge suffisante pour qu'on pût tenter leur séparation par un chauffage ménagé.

Les expériences suivantes ont été instituées dans ce but.

EXPÉRIENCE. — 30 juillet : On prépare une série de tubes contenant des proportions variables de sérum antibactériophage typhique et de bactériophage, ainsi qu'une autre série dans laquelle le sérum est remplacé par la même quantité d'eau physiologique. Après cinq jours de contact les deux séries de tubes sont chauffées à 65° pendant une heure avec le résultat que le bactériophage aux dilutions employées se montre inactivé par ce traitement. D'autre part des expériences parallèles dans lesquelles le sérum antibactériophage typhique dilué a été porté respectivement à 70 et à 75° montrèrent que les anticorps neutralisant le bactériophage sont plus stables que les agglutinines. Celles-ci, pour les dilutions employées, étaient détruites par un chauffage à 70° pendant une heure, alors que les anticorps neutralisant les bactériophages ne l'étaient qu'à 75°. Dans ces conditions, il fallait renoncer à employer la chaleur dans les essais de mettre en liberté les bactériophages contenus dans le complexe bactériophage-antisérum.

LYSE SECONDAIRE NON BACTÉRIOPHAGIQUE. PRODUITS LYTQUES MIS EN LIBERTÉ AU COURS DE LA LYSE. APPLICATION AU CAS DES PNEUMOCOQUES. RAPPORTS NUMÉRIQUES ENTRE BACTÉRIOPHAGES ET BACTÉRIES.

Il résulte de l'ensemble des données connues que les bactériophages n'exercent leur action que sur les bactéries vivantes. Mieux, leur action ne se manifeste que pour autant que les bactéries vivantes soient en voie de multiplication : ce fait est fondamental et constitue une des bases de l'*hypothèse des facteurs héréditaires*.

Or, dans un travail paru en 1926 (1), Twort croyait être parvenu à mettre en évidence la lyse de staphylocoques tués par le bactériophage antistaphylococcique. Ce seul fait suffi-

(1) *The Lancet*, 1924, p. 642.

sant pour rendre insoutenable la *théorie des facteurs héréditaires*, nous avons prié notre collaborateur, Duran-Reynals, de répéter les expériences de l'auteur anglais.

Comme il était à prévoir, les faits avancés par Twort furent confirmés dans tous leurs détails : une suspension de staphylocoque tuée par la chaleur est lysée par un peu de bactériophage antistaphylococcique *si, en même temps que celui-ci on ajoute à la suspension de staphylocoques morts un peu de staphylocoque vivant sensible* (1). Mais si les faits avancés par Twort étaient rigoureusement exacts leur interprétation nous paraissait sujette à caution. Quel était le rôle du staphylocoque vivant dont la présence se montrait indispensable dans les expériences de Twort ?

L'expérience suivante instituée sur notre instigation par Duran-Reynals fournit à ce sujet une première indication. Si l'on distribue dans des tubes qu'on scelle ensuite à la flamme (technique de Jaumain) des suspensions de staphylocoque vivant et de staphylocoque tué, on constate que seuls les premiers s'éclaircissent de façon rapide et marquée : l'autolyse ne se fait dans ces conditions, de façon intense, qu'avec du staphylocoque vivant. Or, il suffit d'ajouter un peu de ce staphylocoque vivant à une suspension de staphylocoque tué pour voir, en tubes scellés, l'autolyse s'étendre à l'ensemble de la suspension, laquelle, sans addition de germes vivants, se maintient indéfiniment trouble.

Nous voyons donc que des résultats tout à fait superposables à ceux de Twort peuvent être obtenus sans intervention aucune des bactériophages : quel que soit le procédé mis en œuvre pour déterminer la lyse des staphylocoques vivants (bactériophagie, atmosphère confinée), cette lyse s'étend ensuite au staphylocoque tué.

L'action directe des bactériophages sur les germes morts était ainsi mise hors de cause. Il n'en était pas moins intéressant d'étudier de plus près ce phénomène qui mériterait presque, lui aussi, le nom de *lyse transmissible*.

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 94, 1926, p. 242. Ainsi que Duran-Reynals le faisait remarquer dans une note de son travail, Gratia et Rhodes, dans une communication qui avait échappé et à lui-même et à Twort, avaient antérieurement fait des constatations analogues.

Nous nous sommes demandé s'il n'était pas possible de transmettre la lyse non seulement d'un staphylocoque vivant sensible à un staphylocoque tué de même souche, mais aussi d'un staphylocoque vivant sensible à un bactériophage donné, à des staphylocoques vivants réfractaires à ce bactériophage.

Les expériences qui suivent montrent que dans une partie des cas, tout au moins, les faits répondent par l'affirmative (1).

EXPÉRIENCE I. — Un bactériophage antistaphylococcique actif pour le staphylocoque blanc n° 18 et complètement inactif pour les staphylocoques 148 jaune et 149 blanc est mis en présence de suspensions de ces trois souches.

Tube I.	Staphylocoque 18 + bactériophage	Lyse complète.
Tube II.	Staphylocoque 148 + bactériophage	Culture normale.
Tube III.	Staphylocoque 149 + bactériophage	Culture normale.

En même temps, on prépare deux tubes en ensemençant simultanément dans chaque un des staphylocoques réfractaires ainsi que le staphylocoque sensible.

Tube IV.	Staphylocoque 148 + staphylocoque 18 + bac- tériophage	Lyse complète.
Tube V.	Staphylocoque 149 + staphylocoque 18 + bac- tériophage	Lyse partielle.

EXPÉRIENCE II. — Un staphylocoque blanc (Nuñez) complètement réfractaire à l'action du bactériophage antistaphylocoque 18 est mis en présence de celui-ci isolément et simultanément avec le staphylocoque sensible.

Tube I.	Staphylocoque Nuñez + bactériophage	Culture normale.
Tube II.	Staphylocoque Nuñez + staphylocoque 18 + bac- tériophage	Lyse complète.

On réussit donc parfaitement, dans certains cas, à transmettre la lyse d'un germe sensible à un germe qui y est normalement réfractaire. Indépendamment de son intérêt théorique, ce fait permet de préparer des lysats de staphylocoques qui par eux-mêmes sont résistants à l'action des bactériophages dont on dispose.

Quel est le mécanisme de cette lyse secondaire? On peut tout d'abord éliminer l'action directe du bactériophage. Quel que soit, en effet, le nombre de passages successifs qu'on fait

(1) Société de Biologie, section de Santiago du Chili, séance du 26 octobre 1931.

effectuer au bactériophage par le mélange staphylocoque sensible + staphylocoque résistant, jamais le filtrat de telles cultures n'acquiert d'action lytique directe pour le staphylocoque résistant. D'autre part, la présence de germes sensibles intacts, que nous avons d'abord cru nécessaire, s'est montrée dans certaines conditions n'être pas indispensable.

EXPÉRIENCE III. — On prépare les tubes suivants :

Tube I.	Staphylocoque 148 + 1 goutte de bactériophage filtré	Culture normale.
Tube II.	Staphylocoque 148 + staphylocoque 48 + 1 goutte de bactériophage filtré. . .	Lyse complète.
Tube III.	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube de bactériophage filtré	Lyse presque complète.
Tube IV.	Staphylocoque 148 + 1 c.c. 5 de bactériophage chauffé à 55°	Lyse presque complète

Donc, lorsqu'on met en œuvre des quantités considérables de lysat bactériophagique de staphylocoque sensible, la lyse des germes résistants se fait même lorsque ce lysat a été au préalable débarrassé de germes vivants par filtration ou par chauffage. La lyse des germes résistants ne peut être attribuée dans ce cas qu'à des produits (diastases?) libérés par le staphylocoque sensible au cours de la lyse bactériophagique.

L'expérience suivante montre que cette lyse est d'autant plus intense que la quantité préalablement dissoute de staphylocoques sensibles est plus forte, autrement dit que le lysat est plus riche en produits (ferments lytiques?) provenant du staphylocoque sensible.

EXPÉRIENCE IV. — On prépare des lysats bactériophagiques « faibles » et « concentrés » de staphylocoque sensible n° 48. Dans le premier cas, le bactériophage est ajouté aussitôt après ensemencement du staphylocoque; dans le second, le bactériophage est introduit quand le milieu est déjà fortement trouble (plusieurs centaines de millions de germes par centimètre cube).

Une première série de tubes reçoit respectivement II, IV, VI, VIII, X, XIV, XXV, XXX et LX gouttes de lysat « faible ». Une autre série de tubes reçoit des quantités croissantes (II, IV, VI, VIII, X gouttes) de lysat « concentré ». On ensemence ensuite dans tous les tubes le staphylocoque résistant 148. Les sept premiers tubes de la première série présentent un développement normal de staphylocoque; la lyse est faiblement marquée pour le tube contenant XXX gouttes et très forte pour celui qui en contient LX. Par contre, pour la série correspondant au lysat « concentré » la lyse est complète à partir du tube contenant IV gouttes.

Enfin, l'expérience suivante montre que, contrairement à ce qui se passe pour la bactériophagie, le facteur actif dans le phénomène de lyse qui nous occupe, loin de se reproduire comme c'est le cas du bactériophage, s'épuise au cours de la lyse.

EXPÉRIENCE V. — On prépare les 4 tubes suivants :

I.	{ Staphylocoque 148 Staphylocoque 18 1 goutte de bactériophage 18 « faible » }	Lyse complète.
II.	{ Staphylocoque 148 1 c.c. 5 de lysat 18 « faible » }	Lyse complète.
III.	{ Staphylocoque 148 Staphylocoque 18 1 goutte de lysat « faible » chauffé à 55°. }	Lyse complète.
IV.	{ Staphylocoque 148 1 c.c. 5 de lysat « faible » chauffé à 55° }	Lyse complète.

Le lendemain, on ensemence du staphylocoque 148 (résistant) dans 4 tubes de bouillon auxquels on ajoute, respectivement, 1 cent. cube de chacun des tubes de l'expérience ci-dessus. On obtient ainsi les 4 tubes suivants :

I'.	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube I. . .	Fort trouble (lyse très faible).
II'.	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube. . .	Trouble (lyse plus marquée).
III'.	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube III. . .	Trouble, presque égal à celui du témoin.
IV'.	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube IV. . .	Trouble marqué (un peu moins fort que pour III').
	Témoin, staphylocoque 148	Culture normale.

Le jour suivant, on fait un troisième passage en ensemençant le staphylocoque 148 dans 5 tubes et en ajoutant aux quatre premiers, respectivement, 1 cent. cube du contenu de chacun des quatre premiers tubes de l'expérience ci-dessus.

On obtient ainsi les tubes :

I ^a .	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube I'.	Trouble, presque égal à celui du témoin.
II ^a .	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube II'.	Trouble, égal à celui du témoin.
III ^a .	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube III'.	Trouble, égal à celui du témoin.
IV ^a .	Staphylocoque 148 + 1 cent. cube IV'.	Trouble, égal à celui du témoin.
	Témoin, staphylocoque 148	Culture normale.

On voit, par ces données, que les produits lytiques, mis en liberté au cours de la lyse bactériophagique de staphylocoques

sensibles et qui déterminent la lyse de staphylocoques résistants, sont consommés pendant cette lyse.

Cette lyse secondaire permet d'expliquer certaines particularités dans l'allure de la bactériophagie. D'autre part, on décele ainsi entre les germes d'un même groupe une hétérogénéité qui échappe aux méthodes sérologiques et dont l'étude vaut d'être approfondie. Pour nous en tenir aux exemples que nous venons de rapporter, le staphylocoque 18 blanc sensible à l'action du bactériophage employé et le staphylocoque blanc 149 qui y est absolument réfractaire ont la même constitution antigénique (agglutination au même titre par un sérum préparé pour l'un d'eux). Or, le staphylocoque 149 est non seulement réfractaire à la lyse par le bactériophage correspondant au staphylocoque 18, mais aussi presque complètement à la lyse par les produits de ce dernier. Le staphylocoque jaune 148, par contre, également réfractaire au bactériophage du staphylocoque 18, est lysé avec une grande facilité par les produits de celui-ci.

Ce phénomène de lyse transmise par produits libérés au cours de la dissolution bactérienne se présente d'ores et déjà comme ayant une certaine généralité et susceptible de diverses applications. C'est ainsi que l'un de nous a montré, en collaboration avec Averbuch (1), que des pneumocoques tués ou des pneumocoques vivants non lysables par la bile deviennent lysables si, en même temps que la bile, on ajoute aux suspensions une petite quantité de pneumocoques vivants lysables. Voici les détails d'une expérience montrant la transmission de la lyse de pneumocoques lysables à des pneumocoques qui, normalement, sont insolubles dans la bile : pneumocoques avirulents vivants ou tués par la chaleur.

EXPÉRIENCE. — Une culture de pneumocoque avirulent, insoluble dans la bile, est distribuée dans deux tubes ; une partie est laissée telle quelle, l'autre portée à 60° pendant une heure. On prépare cinq tubes (à hémolyse) comme suit :

Tube I : Pneumocoques avirulents vivants.

Tube II : Pneumocoques avirulents vivants + bile.

Tube III : Pneumocoques avirulents tués + bile.

(1) *Soc. de Biol., Section de Santiago du Chili*. Séance du 8 juin 1931. Ce travail a été reproduit *in extenso* dans la *Thèse de Médecine* de Averbuch (Santiago 1931).

Tube IV : Pneumocoques avirulents tués + bile + I goutte pneumocoque virulents vivants.

Tube V : Pneumocoques avirulents vivants + bile + I goutte pneumocoque virulents vivants.

Au bout d'une heure, les tubes restent troubles. Au bout de vingt-quatre heures, les tubes IV et V se sont considérablement éclaircis, les tubes I, II, III restant aussi troubles qu'au moment de leur préparation. Au bout de quarante-huit heures, les tubes IV et V se sont éclaircis encore davantage, la lyse de leur contenu étant à peu près complète.

Nous avons dit ailleurs (1) l'intérêt que peuvent présenter ces faits au point de vue pratique (diagnostic différentiel des pneumocoques et des streptocoques). Ici, nous ne désirons retenir qu'un nouvel exemple de *lyse secondaire* par mise en liberté de produits lytiques.

En rapportant plus haut les expériences de lyse secondaire chez les staphylocoques, nous avons dit que ces faits expliquent certaines particularités dans l'allure de la lyse dite bactériophagique. On comprend, en effet, à leur lumière, l'éclaircissement rapide et total des cultures souvent sans augmentation appréciable du titre lytique. On comprend aussi qu'à des cultures (de staphylocoques) ainsi lysées on puisse ajouter, souvent à plusieurs reprises, des quantités nouvelles et importantes de germes qui, eux aussi, subissent la lyse sans augmentation (quelquefois même avec légère diminution) du titre lytique. Ces faits incompréhensibles, tant qu'on les attribuait à la seule action directe des bactériophages, s'expliquent tout simplement par les données que nous venons de rapporter.

Ces expériences nous ont conduits, par ailleurs, à examiner de plus près les rapports numériques existant entre bactéries et bactériophages.

D'après les données que l'on possède sur les dimensions des unes et des autres, le rapport de leurs volumes est de l'ordre de 1 à 1.000.000 approximativement. Dans le cas où la lyse serait due uniquement à l'action directe des bactériophages, toutes les cellules d'une culture devraient être atteintes et, pour nous placer un moment de nouveau au point de vue de la théorie de l'ultravirus parasite, on devrait s'attendre à trouver un nombre élevé d'éléments lytiques pour chaque cellule lysée.

(1) *Bull. de l'Acad. de Méd.*, 107, n° 4, 26 janvier 1932.

Or, il n'en est rien. Même en faisant abstraction des bactéries qui se lysent pendant que le milieu continue à se troubler, le titre lytique des lysats les plus actifs (10^{-9}) correspond à un nombre d'éléments actifs inférieurs (tout au plus à peu près égal) à celui des bactéries présentes dans la culture au moment où celle-ci commence à s'éclaircir. Cette donnée est en parfait accord avec l'hypothèse des facteurs héréditaires dans laquelle on doit s'attendre à trouver un nombre de bactériophages à peu près égal au nombre de bactéries *directement* atteintes.

Des expériences instituées pour suivre les variations du titre lytique en fonction des quantités initiales de germes et de bactériophages, ainsi que de la multiplication des premiers, ont donné des résultats qui parlent dans le même sens. Ces expériences feront l'objet d'un travail spécial et nous n'en donnerons ici que les conclusions :

1° Le titre lytique définitif d'un lysat est indépendant de la quantité initiale de bactériophage (dans les limites étudiées de 1/5 à XX gouttes);

2° Pour les quantités assez élevées de bactériophage employées (I goutte pour 10 cent. cubes de milieu), le titre lytique définitif est quelque peu plus élevé pour les cultures correspondant à un nombre initial de bactéries plus élevé;

3° Le nombre de bactériophages (= titre lytique) augmente de dix fois à peine pendant que le nombre de germes augmente de 10 à 100 fois. Plus tard, et pendant tout le temps qu'augmente le trouble du milieu, ce titre lytique reste constamment inférieur au nombre de germes (donné par les cultures témoins exemptes de bactériophage).

Résumé et conclusions.

1° Pas plus que pour les données d'autres auteurs (voir mémoires antérieurs), il ne nous fut possible de confirmer celles de Béguet et de Plantureux relatives à la réalisation de la bactériophagie expérimentale. Le déterminisme de ce phénomène reste obscur et les cas de bactériophagie observés (en admettant que les diverses causes d'erreur fussent éliminées)

doivent être considérés comme des cas de bactériophagie spontanée ;

2° Les nombreux cas de bactériophagie spontanée signalés de divers côtés sont eux-mêmes sujets à caution, la présence à l'état latent de bactériophages préexistants étant difficile à exclure de façon certaine. La découverte des bactériophages de bactéries sporulées permettant de réaliser ce dernier desideratum, nous avons institué des expériences avec un *B. subtilis* dans cet ordre d'idées. Nous avons bien pu observer, à deux reprises, la bactériophagie spontanée avec des cultures d'une variété (forme muqueuse) de ce *B. subtilis*, mais il nous fut impossible de reproduire ce phénomène avec des cultures préalablement chauffées (à 85°) de ce germe. Fort heureusement, les expériences de L. E. den Dooren de Jong sur le *B. megatherium* et le *B. undulatus* complètent cette lacune et établissent définitivement l'apparition de la bactériophagie dans des cultures traitées de façon à écarter toute possibilité de persistance de bactériophages préexistants. Ces expériences de den Dooren de Jong apportent la condamnation définitive de l'hypothèse parasitaire de la bactériophagie ;

3° En plus de la variété « muqueuse » du *B. subtilis* apparue spontanément et chez laquelle nous avons observé le phénomène de bactériophagie spontanée, nous décrivons une autre variété apparue sous l'action du bactériophage ;

4° Des expériences sur l'action dite « oligodynamique » de l'argent montrent, une fois de plus, que les bactériophages sont beaucoup plus résistants que les bactéries tout en faisant ressortir les différences de sensibilité qui existent, non seulement d'un bactériophage à l'autre, mais aussi entre les unités d'un même bactériophage ;

5° Certaines particularités dans le comportement des bactériophages en tant qu'antigènes (spécificité de *groupe* ou de *type*) ainsi que le rôle joué dans divers processus lytiques par les lipoïdes pouvaient faire penser que ces substances interviennent dans la constitution chimique des bactériophages. Des deux méthodes (biologique et chimique) qui s'offraient pour vérifier cette hypothèse, seule, la première a pu être mise en œuvre. Cette méthode (dont la critique est du reste faite dans le texte) consiste à s'assurer si les lipoïdes extraits de

lysats bactériophagiques sont aptes à donner naissance à des anticorps pour les bactériophages employés ou, plus simplement, à neutraliser les anticorps contenus dans les sérums antibactériophages. Un grand nombre d'expériences faites avec cette méthode ont toutes donné des résultats négatifs. Chemin faisant, un certain nombre d'observations sont rapportées sur l'adsorption des bactériophages et (corollaire de ce fait?) sur l'action antibactériophage des lipoides;

6° Des essais ont été faits, tous avec des résultats négatifs, de mettre en liberté des bactériophages neutralisés par les sérums correspondants sous l'action de divers facteurs : acides ou bases, trypsine, chaleur;

7° Partant du fait de la lyse de staphylocoque mort en présence de staphylocoque vivant et de bactériophage (Gratia et Rhodes, Twort, Duran-Reynals), un groupe de phénomènes est étudié qui mériterait presque, lui aussi, le nom de *lyse transmissible* et auquel nous donnerons celui de *lyse secondaire*. Il s'agit d'un ensemble de faits, dans lesquels des germes normalement insensibles à l'action d'un facteur déterminé (bactériophage, atmosphère confinée, bile) se lysent sous l'action de produits lytiques mis en liberté par ce facteur à partir de germes sensibles. On peut ainsi obtenir la lyse de staphylocoques réfractaires à un bactériophage donné en présence de ce dernier et d'un staphylocoque sensible. On a pu aussi obtenir la lyse par la bile de pneumocoques non lysables (pneumocoques virulents tués, pneumocoques avirulents vivants ou tués) en les mettant en présence de bile en même temps que d'une petite quantité de pneumocoque virulent vivant. L'intérêt pratique de ces faits est indiqué (préparation de lysats, diagnostic différentiel de pneumocoques et de streptocoques) en même temps que la lumière qu'ils jettent sur certaines particularités de la bactériophagie.

8° Quelques données sont rapportées sur les relations numériques qui existent, dans les lysats bactériophagiques, entre bactéries et bactériophages.

Ainsi que nous le disions dans les travaux antérieurs, l'hypothèse des *facteurs héréditaires* proposée par l'un de nous pour rendre compte du phénomène de la bactériophagie (et de cer-

tains processus qui paraissent présenter avec celui-ci des analogies intéressantes) permet d'expliquer, d'une façon satisfaisante, la plupart des particularités de ce phénomène : transmission indéfinie en série, avec reproduction du principe actif, comportement de ce principe au cours de passages sur bactéries différentes; autonomie antigène du principe actif, tous faits qui s'expliquaient parfaitement dans l'hypothèse parasitaire, mais restaient totalement incompréhensibles dans les théories qu'on cherche à lui substituer. En effet, les bactériophages étant, dans l'*hypothèse des facteurs héréditaires*, de la substance vivante, il n'y a rien d'étonnant à ce qu'ils en présentent les attributs.

Aucune des données nouvelles rapportées depuis la publication de notre dernier travail, soit par les auteurs, soit par nous-mêmes, n'est en contradiction avec notre hypothèse; certaines (celles, par exemple, relatives aux rapports numériques entre bactéries et bactériophages) y sont, par contre, nettement favorables. D'autre part, certaines particularités de la lyse bactériophagique qui paraissaient mal explicables dans l'*hypothèse des facteurs héréditaires* s'expliquent parfaitement à la lumière des données sur les phénomènes superposés de lyse par diastases libérées que nous avons examinées au cours de ce travail (lyse secondaire).

Étant donnés l'intérêt et les difficultés du problème et les malentendus que peut provoquer la solution que nous proposons, nous nous permettons de résumer encore une fois notre point de vue.

D'accord avec la presque totalité des bactériologistes, nous voyons dans la bactériophagie un phénomène de variation bactérienne. Pour nous, il s'agit d'une *variation mendélienne*, en ce sens qu'elle est liée à l'existence de certains territoires ou parcelles protoplasmiques (chromatiques? individualisés). Les territoires ou parcelles de protoplasme bactérien sont les *supports matériels* ou les *facteurs* (dans le sens mendélien) de la variation envisagée. Ils déterminent cette variation (tendance à la lyse) [1] chaque fois qu'ils apparaissent dans une cellule,

(1) On ignore tout du mécanisme par lequel ces *facteurs héréditaires* ou *gènes* détermineraient les caractères dont ils sont porteurs. Certains généticiens y voient des ferments doués de la propriété de se reproduire. Comme,

que cela soit par une altération spontanée de sa constitution, par passage de la cellule-mère altérée aux cellules-filles, ou même — et c'est la particularité nouvelle des phénomènes qui nous occupent — qu'ils pénètrent du dehors ayant été mis en liberté dans le milieu extérieur par des cellules atteintes. Ce sont ces *supports matériels* ou *facteurs héréditaires* particulièrement stables dans le cas qui nous occupe qui constituent les *bactériophages* ou *principes lytiques*.

Les recherches récentes sur l'hérédité chez les organismes supérieurs montrent que les variations brusques liées à des *supports matériels* ou *facteurs héréditaires* jouent un rôle beaucoup plus important qu'on ne le supposait jusqu'ici. Ce fait, ainsi que l'existence même de *supports matériels* ou *facteurs* de caractères héréditaires, a pu être établi en premier lieu chez les organismes supérieurs, à reproduction sexuée, car chez eux, il était possible de suivre le sort des caractères héréditaires des parents et montrer qu'ils se comportaient comme des entités indépendantes.

Il n'y a rien d'étonnant à ce que l'existence de tels caractères chez les êtres inférieurs ait passé inaperçue jusqu'ici. Pour cette raison, l'objection qu'entre autres Bordet et Renaux font à notre hypothèse (1), lorsqu'ils se demandent à quel point il est loisible d'étendre aux bactéries la notion des *facteurs héréditaires*, établie par des recherches sur les organismes supérieurs à reproduction sexuée, ne nous paraît pas péremptoire. Comme nous venons de le dire, la séparation des sexes a constitué une circonstance particulièrement favorable pour la mise en évidence des *supports matériels* des caractères héréditaires; elle n'en est nullement une condition.

Des phénomènes fondamentaux de la vie tels que l'hérédité et la variation reconnaissent de toute vraisemblance partout les mêmes mécanismes et sont à coup sûr indépendants du mode de reproduction. Tout ce que l'on peut affirmer, à l'heure

d'autre part, il s'agit d'éléments corpusculaires il y aurait lieu, peut-être, de remettre en honneur, pour eux, le terme tombé en oubli de *ferments figurés*.

On verrait revivre ainsi la notion de diastases « vivantes » (Duclaux) parmi lesquelles viendraient prendre place, tout naturellement, les bactériophages et les principes similaires.

(1) Ces *Annales*, 42, p. 1283.

actuelle, est que les caractères mendéliens paraissent être liés à l'existence de la substance chromatique. Or, celle-ci existe chez les bactéries. Des recherches fort intéressantes publiées tout récemment (1), non seulement confirment l'existence chez ces êtres de l'équivalent d'un appareil nucléaire, mais montrent, de plus, que dans certains cas il s'agit d'un noyau morphologiquement différencié et dont la substance donne une réaction de Feulgen (acide thymonucléique) positive.

Les propriétés de la substance support des caractères héréditaires étant ainsi foncièrement identiques à travers le monde vivant, le mécanisme des variations transmissibles l'est vraisemblablement aussi. Or, répétons-le, l'importance, à ce point de vue, des variations du type mendélien, c'est-à-dire de variations liées à des *supports matériels*, apparaît de plus en plus grande. Il en est de même probablement pour les organismes unicellulaires.

La seule particularité vraiment nouvelle de la bactériophagie, ainsi que des processus que nous en avons rapprochés, tumeurs filtrables, mosaïques des plantes, est celle d'être transmissible, non seulement de cellule-mère à cellules-filles, mais aussi à travers le milieu extérieur de cellule atteinte à cellule normale. Cette particularité implique pour les *supports matériels* des caractères en question une stabilité remarquable qui rend possible leur conservation dans le milieu extérieur. Grâce à cela, les processus envisagés peuvent, lorsqu'ils sont de nature pathologique (comme c'est le cas pour un grand nombre de variations brusques), revêtir les allures de véritables maladies infectieuses.

(1) M. PORCROWSKAJA. *Centralbl. f. Bakt.*, **419**, 1931, p. 353.

LA FÉCONDATION DES GAMÈTES D'HÉMATOZOAIRES

par E. MARCHOUX et V. CHORINE.

I. — LES GAMÈTES D'*HÆMOPROTEUS*

On sait que la fécondation des gamètes de *Plasmodium* se produit dans l'estomac de l'*Anopheles*. Elle s'accomplit même *in vitro* entre lame et lamelle et c'est l'observation des prémices de cette opération qui a donné à Laveran l'assurance qu'il avait découvert le parasite du paludisme.

Il est commode dans les laboratoires de suivre la marche de ce phénomène, par examen du sang d'oiseaux porteurs d'*Hæmoproteus*, parce que seuls les gamètes de cet hématozoaire se trouvent dans le sang circulant et qu'ils y sont parfois tellement nombreux que l'observation des diverses phases de la fécondation en est singulièrement facilitée.

D'ailleurs, l'évolution d'*Hæmoproteus* ne diffère de celle de *Plasmodium* que par l'hôte invertébré qui en est le siège.

Histoire du parasite. — La connaissance que nous possédons aujourd'hui de l'*Hæmoproteus* et du cycle évolutif qu'il poursuit a été acquise lentement. Elle s'est faite par paliers successifs et nous pouvons en diviser la description en six périodes très nettes.

La première commence à la découverte du parasite et se limite à la systématique.

Danilewsky [8] l'observa pour la première fois en 1886 dans le sang de divers oiseaux et notamment sur le freux. Il en distinguait deux formes, la forme vermiculaire et le *polimitus* qui portait des flagelles, et il les considérait comme analogues à celles qui avaient été observées sur l'homme par Laveran. En 1890, il remarqua sur un freux et sur une pie une évolution aiguë, les deux formes primitivement décrites ne représentant que la phase chronique.

En 1890, Kruse [42] réunit sous le même nom d'*Hæmoproteus* toutes les formes qu'avait observées et décrites Danilewsky.

Labbé [43], en 1894, sépara l'agent de ce pseudo-paludisme chronique, dont il fit le genre *Halteridium* en raison des formes en haltères qu'il affecte dans les globules, de celui du paludisme vrai et aigu, entraînant parfois la mort des oiseaux qui en étaient porteurs. Celui-ci fut rangé dans le genre *Hæmameba*, sous le nom de *Proteosoma*.

Le terme *Hæmoproteus* créé par Kruse prévalut sur celui d'*Halteridium* de Labbé.

La deuxième période est caractérisée par de nombreuses recherches auxquelles donna lieu l'*Hæmoproteus* et les polémiques qui divisèrent les protozoologistes en deux camps. Dans l'un se rangent Schaudinn [48] et son école qui croyaient voir cet hématozoaire se transformer en un trypanosome; dans le second, les contradicteurs qui maintiennent l'individualisme des deux parasites. Au premier rang de ces derniers, il faut citer von Wasielowski [22] qui a démontré la coexistence dans le sang de la chevêche d'un *Hæmoproteus* et d'un trypanosome.

Dans un troisième stade, on distingue des signes de sexualité dans les gamètes. Mac Callum [44], et après lui, mais indépendamment du savant américain, l'un de nous [45], observèrent *in vitro* les phénomènes aujourd'hui bien connus de la fécondation de ces gamètes l'un par l'autre. Les gamètes mûrs s'arrondissent et se libèrent par dissolution brusque du globule-hôte. Les mâles expulsent rapidement les microgamètes qui s'agitent violemment, se détachent et se dirigent vers le macrogamète qui s'est préparé à les recevoir par le déplacement du noyau vers la périphérie où il fait légèrement hernie. Un microgamète vient s'engluer sur cette hernie et la fusion nucléaire se produit. Au bout d'un certain temps le macrogamète prend une forme vermiculaire et se déplace activement, constituant l'oocinète.

La quatrième étape a été franchie par Ed. et Et. Sargent [19] qui reconnurent et démontrèrent qu'un Hippoboscide, le *Lynchia maura*, joue le rôle d'agent vecteur dans la transmission de pigeon à pigeon de l'*Hæmoproteus columbæ*. Les frères Sargent n'ayant pas pu suivre dans l'estomac des *Lynchia* le

développement au delà du stade oocinète, admirent que celui-ci passait directement de l'hôte invertébré au pigeon et croyaient en voir la confirmation dans le fait que le pouvoir infectant de *Lynchia* semblait s'épuiser très vite.

Cette opinion fut partagée par de Beaurepaire Aragão [4], Negri [16], Gonder [9] et v. Wasielewski.

A de Beaurepaire Aragão [3] est due la cinquième étape parcourue. Le savant brésilien reconnut qu'en dehors des formes gamétogoniques seules observées dans le sang circulant, il existe une phase schizogonique qui s'accomplit par division multiple du noyau de corps contenus dans les cellules endothéliales des capillaires pulmonaires. Cette découverte d'Aragão, faite en 1907, fut confirmée par Anschütz [2] (1909), Negri (1913), Gonder (1915), v. Wasielewski (1913-1918).

Enfin, la sixième période fut marquée par la découverte, faite par Helen Adie [1], en 1915-1924, chez *Lynchia*, d'un stade évolutif analogue à celui de l'hématozoaire du paludisme chez l'Anophèle. L'oocinète traverse le premier plan cellulaire et se loge dans la paroi de l'estomac. Le noyau se divise un grand nombre de fois dans un kyste qui grossit et fait hernie sur la paroi dans la cavité générale, passant de 7 à 8 μ au quatrième jour à 36 μ au neuvième jour. A ce moment la paroi du kyste, qui jusqu'alors était très résistante, devient fragile et se rompt sous la seule pression du couvre-objet. Il s'en échappe une quantité de sporozoïtes fusiformes qui, comme chez l'Anophèle, envahissent les glandes salivaires et sont émis avec le liquide de sécrétion de ces glandes au moment de la piqure.

Raisons qui ont guidé notre choix. — La facilité avec laquelle on se procure des oiseaux porteurs d'*Hæmoproteus* et la commodité d'examen qui résulte de la nature de ce parasite devaient diriger notre choix pour nos recherches sur les conditions qui président au déclenchement du phénomène de la fécondation.

Dans le sang circulant les gamètes se présentent, quand l'infection est récente, sous la forme de corps pigmentés plus ou moins arrondis, en nombre variable dans un même globule où on peut en trouver jusqu'à onze. A un stade plus avancé, ce nombre se réduit à un ou deux qui s'allongent de chaque côté du noyau jusqu'à se rencontrer. Ils sont un peu rétrécis au

milieu et renflés aux extrémités; c'est ce qui les a fait désigner par Labbé sous le nom d'*Halteridium*.

Pour quelles raisons voyons-nous, au bout de quelques instants, entre lame et lamelle, ces corps parasitaires, qui paraissent immobilisés dans leur forme jusqu'à ce moment, s'animer et procéder à toutes les transformations qui les conduisent jusqu'à la formation de l'oocinète?

Pour essayer de nous en rendre compte, nous nous sommes adressés tout d'abord au parasite que, très communément, on rencontre dans le sang d'un oiseau facile à se procurer, le *Padda oryzivora*, parasite qui a été décrit et nommé par Anschütz, en 1910, *H. oryzivoræ*. Mais la taille de ce petit oiseau ne nous permettait qu'un très petit nombre d'examen sans danger pour son existence.

Nous devons d'avoir pu opérer sur des pigeons à l'obligeance de notre collègue d'Alger, le D^r Edmond Sergent, à celle de son fils, le D^r André Sergent, qui a pris la peine d'aller chercher à Blida des pigeons contaminés avec des *Lynchia maura* et des pupes de cet insecte, à celle de M. Donatien, qui nous a apporté d'Alger à Paris, avec tout le soin désirable, à la fois les oiseaux et leurs parasites.

II. — LE REFROIDISSEMENT N'EXERCE AUCUNE ACTION

Ces éléments sexuels, qui restent indéfiniment immobiles tant qu'ils sont dans la circulation, entrent en mouvement très vite, à condition qu'ils soient parvenus au stade de maturité, dès qu'ils en sont extraits, qu'ils soient conservés *in vitro* ou qu'ils tombent dans l'estomac de l'insecte chargé d'assurer la continuité de leur existence. Cette activité se révèle même dans le tube digestif d'insectes qui ne permettent aucun développement ultérieur. Nöller [47] a vu se produire la fécondation des gamètes d'*Hæmoproteus* et la production d'oocinètes chez beaucoup d'insectes, moustiques divers, larves suceuses de sang, punaises, poux.

L'universalité des circonstances où se produit cette réaction génétique a confirmé tous les observateurs dans l'opinion

émise par Danilewsky qu'elle avait pour moteurs le refroidissement et la concentration du liquide sanguin, phénomène qui se rencontre en effet dans tous les cas où elle apparaît. Telle fut l'opinion de tous les savants qui se sont occupés de la fécondation des gamètes d'*Hæmoproteus*. Cependant il y a quelque raison de penser qu'une autre influence intervient, car si, avec *H. columbæ*, la fécondation ne commence que cinq-dix minutes après l'extraction du sang; elle se produit en quelques minutes avec *H. orizivoræ* et en quelques secondes d'après Claus [5] avec *H. Danilewskyi*. Dans ce dernier cas surtout, il devient au moins difficile d'accepter comme cause l'action si banale de la concentration, sinon du refroidissement. Claus trouve que la température la plus favorable à l'exflagellation des microgamétocytes est entre 33° et 8°,5. Le phénomène ne se produit plus ici au-dessous de 8°, ni au-dessus de 33°, température qui interdit la production des flagelles dans le sang des oiseaux. Les expériences de Claus ont été confirmées par celles de v. Wasielewski.

Conditions de notre expérimentation. — Nous avons voulu tirer au clair cette question spéciale de la température à laquelle les deux auteurs précités attribuent un rôle si important. Toutes nos observations ont porté sur du sang recueilli et conservé *in vitro* soit à la température du laboratoire qui était à ce moment de 13°, soit dans une boîte chauffée à température constante par des lampes à filaments et renfermant le microscope dont seul débordait l'oculaire. La manipulation de la lame porte-objet et de la vis micrométrique se pratiquait par des manches d'étoffe qui se fixaient au poignet et opposaient par l'obturation qu'elles assuraient un sérieux obstacle au refroidissement. La température du milieu intérieur de la caisse était observée sur un thermomètre placé au niveau de la platine et visible au travers de la paroi supérieure vitrée. Nos observations ont été faites à diverses températures et jusqu'à 43°. Le nombre de nos examens, qui a été très grand, nous a permis d'établir des chiffres que nous donnons ci-dessous et qui représentent une moyenne.

Nous avons tenu à bien dissocier l'action des deux phénomènes et pour cela nous avons veillé à écarter le rôle de la

dessiccation en opérant soit sur des lames recouvertes de lamelles bordées à la paraffine, soit dans une atmosphère saturée d'humidité. Cette chaleur humide était entretenue par un courant de vapeur provenant d'un ballon rempli d'eau maintenue à l'ébullition et s'échappant par un tube qui pénétrait dans notre caisse d'examen. L'hygromètre placé à l'intérieur de la boîte restait constamment au voisinage de 100°, c'est-à-dire entre 96 et 99°.

Résultats. — Voici, réunis dans le tableau suivant, les résultats de nos observations faites sur *H. orizivoræ*.

TEMPÉRATURE en degrés	FÉCONDATION en minutes
13	17 à 20
20	6
23	4 à 5
30	2 à 3
36	1 à 1 1/2
39	2 à 3
43	3 à 5

Les oocinètes se forment sans difficulté entre lame et lamelle à des températures variant de 20° à 23°. Les macrogamètes fécondés ne se montrent plus aptes à une transformation ultérieure quand on les conserve à 37° et ils dégènèrent en vingt-quatre-quarante-huit heures.

Si l'on observe l'exflagellation des microgamétocytes d'*H. paddæ* à une température notablement plus élevée que celle que Claus, qui opérait avec un autre parasite, a considérée comme critique, il nous faut reconnaître que le développement ultérieur des macrogamètes s'arrête beaucoup plus tôt, puisqu'à 37° non seulement il n'y a pas formation d'oocinètes, mais les éléments fécondés dégènèrent. En tous cas les phénomènes de la fécondation des macrogamètes par les microgamètes ne sont pas influencés même à 43°, c'est-à-dire à une température supérieure à celle qui est normale chez les oiseaux.

III. — LA CONCENTRATION EST SANS INFLUENCE

Nous avons alors porté nos investigations sur la densité du milieu dans lequel le phénomène est susceptible de se produire. Il est évident que, dans l'estomac de l'insecte hôte intermédiaire, le sang absorbé subit une concentration qu'il est assez difficile de mesurer et de reproduire exactement par l'expérience. Cependant l'absorption par les parois stomacales de l'insecte piqueur est relativement lente; en tout cas elle demande certainement un temps plus long que celui qui suffit au parasite endoglobulaire à poursuivre son évolution jusqu'à la fécondation du macrogamète.

Soustraction de liquide. — On peut essayer de soustraire un peu de liquide à la goutte de sang qui est maintenue entre lame et lamelle. Ce procédé assez brutal ne semble cependant pas exercer une action provocatrice évidente. L'exflagellation et la fécondation se produisent sur la lame ainsi traitée dans le même temps que sur une lame témoin, c'est-à-dire en quatre-vingt minutes à la température de 21-23°.

Dilution. — Devant le peu d'effet d'une soustraction de liquide, nous avons cherché à prendre la question inversement et nous avons voulu voir quelle influence pouvait exercer la dilution. A cet effet, nous avons utilisé un tube effilé sur lequel nous avons marqué d'un index la hauteur du liquide que nous aspirions, puis, après interposition d'une bulle d'air, nous introduisions jusqu'au même index le liquide que nous voulions additionner au premier. Nous soufflions alors le tout sur une lame flambée et nous procédions à un mélange intime, avant de prélever la quantité qui nous était nécessaire pour faire nos observations microscopiques entre lame et lamelle.

Nous avons ainsi mélangé du sang de *Padda* parasité avec du sérum de poule normale ou du sérum humain, la petite taille de l'animal ne nous permettant pas l'emploi de son

propre sérum. Les résultats de nos observations se trouvent consignés dans le tableau ci-dessous.

		FÉCONDATION en minutes
Température : 21°.	{ Sang parasité seul	5
	{ Sang parasité + sérum poule	5
	{ Sang parasité + sérum humain.	5

Comme on le voit, ni la dilution, ni la nature du sérum n'exercent la moindre influence sur la marche du phénomène.

Les préparations conservées nous ont convaincus que la fécondation était ultérieurement suivie de la production d'oocinètes dans les délais ordinaires.

Densité du milieu en NaCl. — Dans cette expérience, la densité du milieu restait constante, que se passerait-il si on la faisait varier? A cet effet, au lieu de sérum, on a introduit, avec le sang parasité, une égale quantité de solutions de chlorure de sodium à des titres divers. Les résultats de nos expériences se trouvent condensés dans le tableau ci-dessous.

TABLEAU I.

NATURE du liquide ajouté	RÉSULTATS
Eau distillée.	Les globules hémolysés libèrent les gamètes qui se gonflent et éclatent.
NaCl à 0,15 p. 100 . . .	Les gamètes se comportent comme dans l'eau distillée.
NaCl à 0,25 p. 100 . . .	Gamètes non altérés; la fécondation se produit en cinq minutes, mais l'exflagellation est gênée; elle ne s'accomplit que partiellement et irrégulièrement. Il y a cependant production d'oocinètes.
NaCl à 0,5 p. 100. . . .	Fécondation en 5 minutes. Oocinètes.
NaCl à 1 p. 100	Fécondation en 6 minutes. Oocinètes.
NaCl à 2 p. 100	Les gamètes s'arrondissent, se libèrent, mais l'exflagellation ne s'accomplit que difficilement. Nous ne l'avons observée que sur un seul exemplaire. Ni fécondation, ni oocinètes.
NaCl à 3 p. 100	Pas de fécondation. Les gamètes restent inclus dans les globules sans changer de forme.

Ni la soustraction de liquide, ni la dilution du sang n'influent sur la rapidité ou l'achèvement du phénomène de la fécondation. En revanche, et contrairement à l'opinion que la

concentration favoriserait la fécondation, nous voyons que l'accroissement de la densité du milieu exerce une action empêchante. Mais cet accroissement doit être relativement considérable. L'addition à parties égales de solutions chlorurées comprises entre 2,5 et 10 p. 1.000 n'arrête pas la fécondation, ni la formation d'oocinètes.

IV. — L'OXALATE DE K ET LE CITRATE DE Na N'EMPÊCHENT PAS LA FÉCONDATION

Pour la suite de notre expérimentation, il nous fallait pouvoir conserver du sang pendant un temps assez long sans qu'il se coagule. Sans doute, nous avions la ressource de l'extraire en tubes paraffinés, et c'est ce que nous avons fait tout d'abord. Mais puisqu'il existe des procédés plus simples de conservation, couramment employés dans les laboratoires, il nous a paru nécessaire de vérifier si l'addition d'oxalate de potassium ou de citrate de sodium au sang exerçait sur les gamètes une action fâcheuse ou gênait leurs fonctions.

Oxalate de potassium. — Cette substance a été employée en solutions à titres divers qui ont été mélangées au sang à examiner en proportions variées.

1^o Solution d'oxalate de potassium à 10 p. 100 mélangé à du sang de *Padda* parasité dans la proportion de une partie pour 9 de sang.

Les gamètes s'arrondissent et se libèrent très tardivement. On ne voit pas d'exflagellation. Après un premier effort, les gamètes sont paralysés.

2^o Solution à 5 p. 100 mélangée à parties égales avec du sang parasité.

La formation des gamètes est tardive. Les exemples d'exflagellation sont très rares et très irréguliers. Les microgamètes peu mobiles ne paraissent pas arriver jusqu'à la fécondation des macrogamètes qui jamais n'a été observée.

3^o Solution à 2 p. 100. Mélange à parties égales. Exflagellation très irrégulière, et qui souvent se produit à l'intérieur du globule rouge non détruit. Les microgamètes sont d'ailleurs peu mobiles et les macrogamètes ne sont pas fécondés.

4^o Solution à 1 p. 100. Mélange à parties égales. Dissolution des globules rouges. Les gamètes commencent à s'arrondir, mais se détruisent peu de temps après sans qu'il ait été observé trace d'exflagellation.

5° Solution à 1 p. 100 dans une solution de chlorure de sodium à 0,5 p. 100. La fécondation se produit normalement.

Il faut donc conclure de cette série d'expériences que l'oxalate de potasse en solution faible, mais isotonique, n'est pas toxique pour les gamètes, et ne gêne pas leur transformation.

Citrate de sodium. — Le citrate de sodium, tant seul qu'en association avec le chlorure de sodium, a fait l'objet d'un grand nombre d'essais qui se trouvent résumés dans le tableau ci-joint.

Citrate de sodium à 15 p. 1.000	Fécondation normale.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 1 p. 1.000 .	Fécondation normale.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 2 p. 1.000 .	Fécondation normale.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 3 p. 1.000 .	Fécondation normale.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 4 p. 1.000 .	Fécondation normale.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 5 p. 1.000 .	Fécondation normale.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 6 p. 1.000 .	Fécondation un peu retardée (10 minutes).
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 7 p. 1.000 .	Fécondation un peu retardée (10 minutes).
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 8 p. 1.000 .	Fécondation un peu retardée (12 à 14 minutes).
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 9 p. 1.000 .	Fécondation un peu retardée (15 minutes).
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 10 p. 1.000 .	Fécondation irrégulière (25 minutes).
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 11 p. 1.000 .	Fécondation rare et irrégulière (25 à 30 minutes).
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 12 p. 1.000 .	Néant. Gamètes arrondis en 15 à 25 minutes.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 13 p. 1.000 .	Néant. Gamètes arrondis en 15 à 25 minutes.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 15 p. 1.000 .	Néant en 45 minutes.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 17,5 p. 1.000 .	Néant en 45 minutes.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 20 p. 1.000 .	Néant en 45 minutes.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 25 p. 1.000 .	Néant en 45 minutes.
Citrate de sodium à 15 p. 1.000 + NaCl 30 p. 1.000 .	Globules contractés.

Le citrate de soude est donc essentiellement maniable et, en association avec de faibles quantités de chlorure de sodium, permet aux phénomènes de gamétogonie de se produire normalement.

V. — C'EST LE CO^2 DU SANG QUI FREINE LE PHÉNOMÈNE

On sait que le sang perd rapidement, après son extraction des vaisseaux, le CO^2 qu'il renferme toujours dans la circulation.

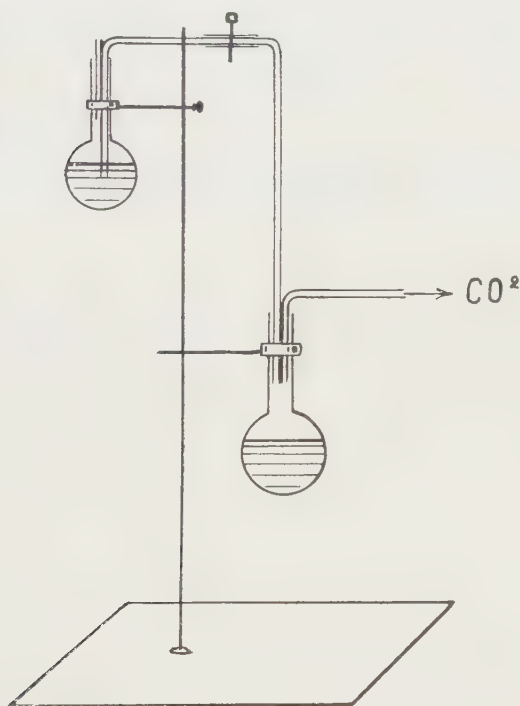


FIG. 1.

La fécondation ne se produit pas en présence de CO^2 . — Puisque ni le refroidissement, ni la concentration, n'interviennent pour favoriser la déhiscence des gamètes d'hématozoaires et la fécondation, il était indiqué de chercher si la clef du phénomène ne se trouvait pas dans les variations de la réaction du sang dues au dégagement du CO^2 .

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé aux expériences suivantes.

N° 1. — Une goutte de sang de Padda parasité est exposée dans la boîte que nous avons ci-dessus décrite, à un courant [de CO_2 produit par réaction d'une solution d'acide tartrique tombant goutte à goutte dans une solution de bicarbonate de soude à l'aide de l'appareil monté comme l'indique la figure. Le tube de dégagement du ballon 2 pénètre dans la boîte.

Après avoir maintenu la goutte de sang pendant quelques secondes dans une atmosphère chargée de CO_2 , elle a été recouverte d'une lamelle et lutée à la paraffine.

Ainsi préparé, le sang reste sans changement, les parasites gardent leur forme en hâllère et demeurent indéfiniment immobiles, alors que dans une goutte-témoin, recueillie en même temps, on assiste à la déhiscence des gamètes et à la fécondation.

Ainsi donc, il suffit de maintenir le sang sous l'influence de CO_2 pour empêcher la déhiscence des gamètes. Mais si l'on laisse CO_2 se dégager, les résultats changent.

Elle s'accomplit si l'on écarte la CO_2 . — N° 2. — On prélève 4 cent. cubes de sang, à un pigeon infecté d'*Hæmoproteus*, et on en dispose la moitié, 2 cent. cubes, dans un verre à pied contenant 3 cent. cubes de solution citratée chlorurée obtenue par dissolution dans un litre d'eau distillée de 15 grammes de citrate de soude et de 4 grammes de NaCl. Cette portion servira de témoin.

La deuxième partie du sang, 2 cent. cubes, est déversée dans un deuxième verre à pied contenant la même quantité d'eau chlorurée-citratée dans laquelle passe un courant faible et continu de CO_2 . L'état des gamètes de l'un et de l'autre tube a été périodiquement suivi par examens microscopiques, dont voici les résultats.

TABLEAU II.

HEURE des examens	VASE TÉMOIN	VASE A CO_2	EXAMEN du contenu du vase à CO_2 après exposition de la préparation à l'air
17,35	Gamètes sphériques. Exflagellation.	Sans changement.	
17,42		Sans changement.	Premier prélèvement.
17,50		Sans changement.	Exflagellation-fécondation.
18,03		Sans changement.	Deuxième prélèvement.
18,10		Sans changement.	Exflagellation-fécondation.
18,30		Sans changement.	Troisième prélèvement.
18,35		Sans changement.	Gamètes sphériques.
18,50		Sans changement.	Exflagellation-fécondation.
18,53		Sans changement.	Quatrième prélèvement.
19,05		Sans changement.	Gamètes sphériques.
19,15		Sans changement.	Exflagellation-fécondation.
19,23		Sans changement.	24 heures après oocinètes.

Voici une autre expérience faite dans les mêmes conditions, n° 3.

TABLEAU III.

HEURE des examens	VASE A CO ²	RÉSULTATS DES EXAMENS
		des prélèvements faits dans le vase exposé à l'air
15,25	Sans changement.	
15,35	Sans changement.	
15,50	Sans changement.	Premier prélèvement. Fécondation à 15 h. 55.
16,15	Sans changement.	Deuxième prélèvement. Fécondation à 16 h. 22.
16,35	Sans changement.	
16,40	Sans changement.	Troisième prélèvement. Fécondation à 16 h. 50.
16,45	Sans changement.	
16,50	Sans changement.	
16,55	Sans changement.	Quatrième prélèvement. Fécondation à 17 h. 10.
17,10	Sans changement.	Cinquième prélèvement. Fécondation à 17 h. 15.
17,25	Sans changement.	Sixième prélèvement. Fécondation à 17 h. 35.
17,30	Sans changement.	

Comme l'indiquent les deux expériences précédentes, la fécondation en l'absence de CO² se produit normalement, mais plus le prélèvement est tardif, moins il y a de gamètes qui se mobilisent.

Ainsi, tandis que les gamètes s'étaient déjà arrondis sept minutes après le début de l'expérience et qu'on observait huit minutes plus tard l'exflagellation des microgamétocytes et la fécondation des macrogamètes, ces mêmes organismes restaient immobiles jusqu'à la fin dans le vase à CO². Quatre prises successives faites du début à la fin de l'expérience ont, après exposition à l'air, montré que, dès l'expulsion de CO², les gamètes réagissent quoique de plus en plus lentement et de plus en plus faiblement. Encore après une heure trente de contact, les macrogamètes fécondés se transforment en oocytes.

In vitro l'action forte et prolongée du CO² est néfaste. — Aussi longtemps que se prolonge l'action de CO², les gamètes restent immobiles, mais sont susceptibles de recouvrer leur activité dès que le gaz se dégage, au moins pendant un temps assez long.

N° 4. — Dans un tube de 17 millimètres muni à moitié de sa hauteur (fig. 2) d'une tubulure perpendiculaire en communication avec une source

de CO_2 , on dispose 3 cent. cubes de solution chlorurée citratée un quart d'heure avant d'y ajouter 3 cent. cubes de sang de pigeon parasité. Le tube est fermé dès le début de l'expérience par un bouchon de caoutchouc. Après avoir ajouté le sang de pigeon, on maintient quelques minutes la communication avec la source de CO_2 en enlevant le bouchon, puis on l'interrompt avec une pince de Mohr et on rebouche.

3 novembre 1931. — 15 h. : Début de l'expérience.

16 h. 30 : Prélèvement de quelques gouttes qui seront exposées dans un verre de montre.

16 h. 32 : Gamètes sphériques rares.

16 h. 36 : Gamètes sphériques nombreux.

16 h. 39 : Exflagellation.

4 novembre 1931. — 9 h. 30 : Prélèvement de quelques gouttes qui sont exposées à l'air. A l'examen, on voit quelques gamètes arrondis. Mais pendant une heure et demie, on ne voit plus aucun changement. Les préparations colorées montrent que les gamètes sont altérés.

N° 5. — 3 cent. cubes de sang de pigeon parasité sont mélangés dans les mêmes conditions que pour l'expérience précédente avec 3 cent. cubes de solution chlorurée citratée et soumis à l'action de CO_2 . Un prélèvement est fait toutes les heures.

9 heures : Début de l'expérience.

10 heures : La fécondation se produit en treize minutes.

11 heures : La fécondation se produit en treize minutes.

12 heures : La fécondation se produit en quinze minutes.

13 heures : La fécondation se produit en vingt-vingt-deux minutes.

14 heures : Fécondation irrégulière en vingt-cinq-trente minutes. Les microgamètes sont peu mobiles. Un certain nombre de gamètes sont déjà arrondis, mais, en général, dans des globules entiers.

15 heures : La plupart des gamètes sont arrondis dans des globules généralement entiers. Certains d'entre eux s'arrondissent sous l'œil dans la préparation, mais on n'observe pas d'émission de flagelles.

La préparation est laissée à 27° pour voir s'il va se former quelques occinètes.

18 novembre 1931. — Pas d'occinètes dans la préparation. La coloration révèle que les gamètes sont altérés.



FIG. 2.

Cette expérience complète la précédente. Elle montre que, en atmosphère de CO_2 , quelques gamètes se conservent vivants pendant cinq heures, mais la plupart sont morts et ceux qui survivent sont peu aptes à remplir leurs fonctions. Il était donc bien naturel de constater la mort de ces organismes après vingt-quatre heures.

De cet ensemble d'expériences, nous sommes autorisés à conclure que la présence de CO_2 suffit à arrêter l'évolution des gamètes et la fécondation. Ce rôle d'arrêt n'est pas sans danger pour ces microorganismes qui deviennent de plus en plus paresseux et finissent par s'immobiliser définitivement après cinq heures. Il est vrai d'ajouter que la quantité de CO_2 est, en ce cas, beaucoup plus considérable que dans le sang.

VI. — MESURE ET VARIATION DU pH DU SANG CHEZ LE PIGEON

Méthodes de mesure. — Le dégagement de CO_2 du sang entraîne un changement de réaction du liquide vital bien connu, puisque, dans la mesure du pH sanguin, on doit prendre les précautions les plus soigneuses pour empêcher le dégagement spontané de ce gaz.

La mesure des variations du pH sanguin était donc indispensable avant et après départ de CO_2 .

Pour cet examen, il faut disposer d'une certaine quantité de sang; le Padda, qui meurt dès qu'on lui en a retiré XII à XV gouttes, ne pouvait nous permettre cette mesure. On s'est servi du sang de poule.

Le pH a été mesuré au potentiomètre dans l'électrode de Sannié avec toutes les précautions ordinaires. Le sang de ce volatile soustrait à l'action de l'air est au $\text{pH} = 7,3-7,4\dots$, suivant les individus. L'air agit rapidement pour modifier ce chiffre. Alors que le sang d'un même animal, maintenu à l'abri de l'air, est au $\text{pH} = 7,38$, il est monté à l'air, exposé en couche mince dans une boîte de Petri, en quatre minutes à 7,65 et en cinq minutes à 7,75.

Avec le pigeon, nous avons utilisé pour le même objet la méthode colorimétrique et nous nous sommes servis du procédé de Cullen [6], modifié par Hawkins [10], avec lequel on peut faire une mesure sur $1/2$ à 1 cent. cube de sang.

Cette technique ne permet pas d'obtenir en chiffre absolu la concentration en ions H^+ . Pour connaître celui-ci, il est nécessaire d'y introduire une correction que Cullen a établie par comparaison avec les chiffres établis au potentiomètre. Les

tables ne se rapportent qu'au sang de quelques animaux, le cheval, le lapin, le chien et au sang humain. Mais la précision est très suffisante pour nous permettre de mesurer les variations du pH dans le sang de nos animaux d'expérience.

La mesure se fait par mélange de sang avec une solution physiologique de composition suivante :

Chlorure de sodium, en grammes.	8
Oxalate de potassium neutre, en grammes	3
Solution d'indicateur rouge de phénol, en centimètres cubes.	100
Eau distillée débarrassée de CO_2 par ébullition et refroidie :	
Quantité suffisante, en centimètres cubes	1.000
Ce liquide est ajusté à $pH = 7,3$.	

Le pH du sang du pigeon. — C'est par cette méthode que nous avons reconnu le taux du pH dans le sang des pigeons normaux et des pigeons infectés.

	PIGEONS normaux	PIGEONS infectés
pH	7,42	7,38
pH	7,32	7,36
pH	7,16	7,32
pH	7,29	
pH	7,38	
pH	7,31	

Si l'on écarte le résultat obtenu chez le troisième de nos pigeons normaux, résultat qui peut dépendre d'une erreur d'expérience, on voit que les chiffres varient peu et restent en moyenne 7,34-7,35.

S'il est possible de modifier le pH pathologique du sang, il est au contraire très difficile d'intervenir efficacement pour élever ou abaisser le pH normal.

Limites du pH favorable. — Nous nous sommes alors préoccupés de chercher quelles sont les limites de variation minima du pH susceptibles de permettre ou d'empêcher le déclenchement du phénomène primordial de la gamétogonie.

Avec une solution de HCl à 1 p. 1.000, on ajuste de l'eau physiologique oxalatée de telle façon qu'en additionnant, à 5 cent. cubes de celle-ci, 1/2 cent. cube de sang, on obtienne qu'un pH du mélange = 7,3 se maintienne au moins pendant quinze minutes. Cette opération exige un certain tâtonnement, mais est en définitive assez facile à réussir.

Nous avons constaté dans deux expériences que, même après une demi-heure, il n'y avait dans ce mélange aucune manifestation annonçant la fécondation. La première fois le pH à ce moment était $= 7,31$, la deuxième $= 7,36$.

Nous pouvons donc dire qu'à pH 7,36 les gamètes restent immobiles dans les globules qui les contiennent. Il fallait déterminer maintenant le pH minimum favorable au déclenchement du mouvement.

1/2 cent. cube du sang d'un pigeon parasité dont le pH sanguin $= 7,32$ est mélangé avec 5 cent. cubes d'eau physiologique dont la composition est donnée ci-dessus. Le tout a été exposé à l'air dans un verre à pied stérile. Dès que les gamètes commencent à prendre la forme sphérique, le liquide est recouvert d'huile de vaseline pour arrêter le dégagement de CO_2 . Les phénomènes d'exflagellation se montrent au bout de vingt-cinq minutes. A ce moment, on détermine le pH du mélange. Une première expérience a donné $pH = 7,57$, une deuxième $pH = 7,55$ et une troisième $pH = 7,59$.

Nous pouvons donc, avec peu de chances d'erreur, considérer que $pH = 7,55$ représente l'alcalinité minima du sang qui permette l'émission des microgamètes.

Le pH du sang est très stable. — Sur des animaux soumis à la respiration artificielle précipitée, Dale et Evans [7] sont parvenus, par injection intraveineuse de bicarbonate de soude, à élever le pH jusqu'à 7,97 et en y ajoutant l'effet du sommeil provoqué par l'uréthane, à 9,00.

Dans l'espoir de provoquer la production des phénomènes de fécondation dans le torrent circulatoire, nous avons essayé l'injection de carbonate de soude en solution à 2 p. 100 sans l'accompagner de la respiration artificielle qui eût exigé un outillage dont nous ne disposions pas.

Dans ce but, à trois pigeons nous avons injecté dans les veines une solution à 2 p. 100 de carbonate de soude dans l'eau distillée, à la dose de 5 cent. cubes pour les pigeons 1 et 2, de 2 cent. cubes pour le troisième. La mesure du pH nous a donné les chiffres suivants :

	PIGEON 1	PIGEON 2	PIGEON 3
Avant injection	7,32	7,29	7,38
5 minutes après	7,42	7,47	7,42
15 minutes après	7,47	7,45	7,43
1 heure après	7,34	7,30	7,36
3 heures après	7,32	Mort.	7,36

L'injection d'un liquide alcalin même aussi alcalin que le carbonate de soude n'entraîne donc que des changements insignifiants dans le pH du sang.

Le borate de soude n'excite pas la schizogonie. — Verain et Chaumette [21], dans leur excellent petit livre sur le pH en biologie, conseillent, pour corriger l'acidose, l'emploi du borate de soude par injection intraveineuse. Nous avons voulu savoir si ce sel ne nous donnerait pas un résultat meilleur que le carbonate de soude.

Un pigeon parasité reçoit 2 cent. cubes d'une solution de borate de soude à 6 p. 100 dans la veine de l'aile. Le sang est examiné toutes les cinq minutes pour vérifier l'état des gamètes. L'expérience commence à 15 h. 25.

A 15 h. 30, aucun changement.

A 15 h. 35, aucun changement.

A 15 h. 40, le nombre des parasites semble avoir diminué.

A 15 h. 45, parasites en nombre à peu près égal.

A 15 h. 50, parasites en nombre à peu près égal.

A 15 h. 55, parasites en nombre à peu près égal.

A 16 h. 5, parasites en nombre à peu près égal.

A 16 h. 15, parasites en nombre à peu près égal.

A 16 h. 30, parasites en nombre à peu près égal.

A 17 heures, parasites en nombre à peu près égal.

Trois jours plus tard, le nombre des parasites a manifestement augmenté, on peut en compter deux ou trois petits et arrondis dans un même globule, comme au début de l'infection.

Pour vérifier d'aussi près que possible la réalité de cette observation, nous avons décidé de compter les parasites contenus dans un même champ du microscope avant ou après l'injection de borate de soude.

Le même pigeon était porteur de parasites dans la proportion de 7,3 par champ en préparation colorée. On lui injecte dans la veine 2 cent. cubes de borate de soude à 5 p. 100.

Une demi-heure après, le comptage des parasites donne le chiffre par champ de 6,3.

Les frottis prélevés une demi-heure, une heure, trois heures et cinq heures plus tard fournissent le même tableau.

Nous ne pouvons donc attribuer au borate de soude les changements qui se sont produits lors de la première observation et il nous faut les rapporter à une raison inconnue et contemporaine.

Au total, toutes nos tentatives de modifier le pH assez profondément pour provoquer la fécondation *in vivo* ont échoué et seraient peut-être à reprendre ultérieurement avec un outillage qui permette l'emploi du procédé de Dale et Evans.

VII. — C'EST L'ACIDITÉ DE CO^2 QUI AGIT

HCl agit comme CO^2 . — Nous n'avons pas encore déterminé l'action de CO^2 . Ce gaz agit-il par simple action de présence, en vertu d'une qualité spéciale empêchant la transformation des gamètes, ou intervient-il par l'acidité qu'il confère au sang?

Pour s'en rendre compte, il convenait de faire intervenir une autre substance jouissant de propriétés acides, tel que HCl par exemple.

En ajoutant à du sang parasité une quantité égale d'un liquide de Tyrode renfermant 0 gr. 9 de carbonate de soude et 1 cent. cube d'acide chlorhydrique à 39° Baumé, titrant $pH = 6,6$, on obtient un mélange qui titre $pH = 7,6$.

La fécondation des macrogamètes s'accomplit normalement et la formation des oocinètes lui succède.

Il résulte de cette expérience préliminaire que l'addition de liquide de Tyrode convenablement ajusté n'exerce aucune action fâcheuse et peut sans inconvénient être utilisé dans le but que nous nous proposons.

Si l'on ajoute une quantité d'un Tyrode plus acide renfermant 2 cent. cubes d'acide chlorhydrique au lieu d'un, à 1 goutte de sang de paddy infecté d'*Hæmoproteus*, laissée à l'air pendant environ cinq minutes pour permettre au CO^2 de se dégager, on a ramené le mélange au $pH = 7,2$.

Dans ces conditions, le phénomène de la fécondation est totalement arrêté.

Restait à voir si, au lieu d'un arrêt, cette addition de liquide acide n'avait pas amené la mort des hématozoaires.

Pour s'en assurer on a, au bout de quinze minutes, neutralisé le mélange à l'aide d'une solution de bicarbonate de soude à 2 p. 100. Un mouvement s'est produit dans la préparation, les gamètes se sont arrondis et ont fait éclater les globules dans lesquels ils étaient contenus. Mais tout s'est arrêté là et il ne s'est produit aucune exflagellation de microgamétocytes,

C'était là une preuve que le liquide acide n'avait pas tué les microorganismes parasités et une indication que, sans doute, le liquide de neutralisation agissait trop brutalement.

Puisque le liquide de Tyrode acide était bien supporté, il convenait d'essayer de le neutraliser par un liquide de Tyrode alcalin.

1 goutte de liquide de Tyrode de $pH=3,66$ ajoutée à du sang de paddy débarrassé de CO_2 ramène le mélange au $pH=6,43$. Dans ces conditions, comme dans l'expérience précédente, aucun phénomène de fécondation ne se produit.

Un liquide de Tyrode alcalin remonte le mélange au $pH=7,6$. Les gamètes, précédemment immobilisés, se mettent en mouvement et la fécondation se passe normalement jusqu'à la formation des oocinètes.

Une série d'observations successives nous a montré que ces gamètes si sensibles aux acides, qui s'immobilisent à $pH=7,3$, accomplissent leurs fonctions très régulièrement à partir de $pH=7,6$ et continuent à se comporter encore de même à $pH=9,0$.

Il résulte donc de cet ensemble d'observations et d'expériences que CO_2 agit dans le sang en vertu de sa fonction acide et non pas, comme on aurait pu le penser, en vertu de qualités spéciales.

VIII. — INFLUENCE DE L'OXYGÈNE

Suivant R. Ross et Claus la fécondation exige, pour se produire, la présence de l'oxygène de l'air. En l'absence de ce gaz le phénomène est arrêté.

Nous avons essayé de vérifier cette assertion pour *H. columba*. Tout d'abord, nous avons recherché dans quel temps minimum se produit l'exflagellation.

Temps minimum exigé pour l'exflagellation. — A cet effet, nous avons à nombreuses reprises observé le moment précis où nous sont apparues les différentes phases du phénomène. Voici le résultat de trois de ces examens comme exemples :

Une goutte de sang de pigeon infecté est, immédiatement après la prise, recouverte d'une lamelle et placée sur la platine du microscope. Température = 21°.

	1	2	3
Heure du premier examen.	16,10	16,25	16,43
Heure de la libération des gamètes . . .	16,14	16,23	16,47
Heure de l'exflagellation	16,17	16,31	16,51

On voit que l'exflagellation se produit en six et huit minutes, autant que peut permettre de l'établir un examen attentif qui, évidemment, ne peut porter à la fois sur tous les gamètes. Cependant, un œil exercé saisit très vite, sur une grande surface, quels sont ceux de ces corps dont l'agitation des grains de pigment annonce la sortie prochaine des microgamètes. En fixant son attention sur un de ceux où l'agitation est plus marquée, on ne tarde pas à voir fouetter les flagelles.

La fécondation se produit sous lamelle bordée. — Contrairement à l'opinion de Ross et Claus, nous avons reconnu que la fécondation se produit sous une lamelle bordée après le temps nécessaire à une première observation, et il se forme des oocinètes qu'on met en évidence par la coloration.

Le remplacement de l'air par H ne l'empêche pas. — Par comparaison, on observe ce qui se passe en atmosphère d'hydrogène après action du vide.

A 3 cent. cubes d'eau physiologique citratée, préalablement bouillie et rapidement refroidie, dans un tube préparé pour y faire le vide, on ajoute 3 cent. cubes de sang de pigeon infecté. On fait le vide sous une dépression de 72 centimètres et on ouvre sur l'hydrogène. La même opération est répétée à plusieurs reprises. Le tout dure deux minutes et demie. On laisse le tube dans l'atmosphère d'hydrogène jusqu'à la dixième minute. A ce moment, on fait un prélèvement et l'examen microscopique permet de voir que déjà les microgamètes se sont libérés. On voit encore quelques gamètes avec deux ou trois flagelles très mobiles.

Une deuxième expérience faite dans les mêmes conditions donne les mêmes résultats en cinq-six minutes. Vingt-deux heures plus tard, il y a des oocinètes piriformes que la coloration met en parfaite évidence.

L'extraction de l'hydrogène et son remplacement par de l'hydrogène non seulement n'arrête pas la fécondation, mais n'en ralentit même pas la course. Il est vrai que l'extraction

de l'oxygène est forcément incomplète et l'on peut penser qu'il en reste toujours assez pour que les gamètes se mobilisent.

Le gaz d'éclairage ne l'arrête pas sûrement. — Nous avons pensé obtenir un résultat plus net en profitant du pouvoir remarquable de déplacement de l'oxygène par l'oxyde de carbone et nous avons soumis du sang parasité à l'action du gaz d'éclairage.

Dans deux verres à pied, on dispose une même proportion, 3 cent. cubes, d'eau physiologique citratée à raison de 4 grammes de NaCl et de 15 grammes de citrate de soude pour 1.000, mélange dont nous avons reconnu plus haut les propriétés inoffensives. A chacun d'eux on ajoute 3 cent. cubes de sang de pigeon parasité. L'un reste comme témoin. Dans le second on fait passer un courant de gaz d'éclairage. La température, au moment de l'expérience, est + 16°.

TABLEAU IV.

HEURES	VASE TÉMOIN	VASE A C.O
11,45	Commencement de l'expérience.	
11,50	Pas de changement.	Pas de changement.
11,55	Gamètes arrondis.	Gamètes arrondis.
12	Gamètes arrondis.	Gamètes arrondis.
12,05	Microgamètes rares.	Gamètes arrondis.
12,10	Microgamètes et fécondation.	Microgamètes rares et peu mobiles

Il résulte de cette expérience que la transformation des gamètes a commencé en même temps dans les deux vases, mais que la suite du phénomène s'est poursuivie très inégalement dans l'un et dans l'autre. Sous l'influence du gaz d'éclairage, la transformation des macrogamètes s'est arrêtée.

Chose curieuse, il arrive cependant que se maintienne l'activité des macrogamètes. C'est ce que nous voyons dans l'expérience suivante conduite à peu près dans les mêmes conditions, sauf que le courant de gaz a été introduit dans le vase avant d'y ajouter le sang parasité (voir tableau V).

Nous voyons ici la fécondation se poursuivre jusqu'à son terme normal dans les deux vases, mais très faiblement dans le vase où le gaz s'est dégagé.

Et voici qu'une expérience faite exactement sur le même type, mais à 39°, nous permet d'observer que le phénomène se passe d'une façon identique dans les deux vases. La raison en

TABLEAU V.

HEURES	VASE TÉMOIN	VASE A GAZ D'ÉCLAIRAGE
17,30	Commencement de l'expérience.	
17,35	Gamètes arrondis.	Gamètes arrondis.
17,38	Microgamètes et fécondation.	Microgamètes et fécondation. On arrête le courant à 17 h. 45.
Le sang des deux vases est conservé à la température du laboratoire à l'obscurité.		
Après 24	Oocinètes.	Commencement de la formation des oocinètes, d'ailleurs plutôt rares.

est que l'action CO a été très courte, en raison de la rapidité de production du phénomène à cette température, et n'a duré que deux-trois minutes au bout desquelles on a vu la fécondation se produire normalement.

CO² en présence de CO est un frein insuffisant. — Le CO se fixant énergiquement sur l'hémoglobine et, à condition d'agir pendant un temps court, n'exerçant que peu d'influence sur le cours des phénomènes de fécondation, il était permis de se demander si le gaz d'éclairage n'était pas susceptible de contrarier le freinage de CO². C'est pour essayer d'élucider ce point particulier qu'ont été conçues les deux expériences suivantes :

Dans deux verres, dont l'un servant de témoin, on dispose du sang de pigeon parasité, 3 cent. cubes pour chacun, en présence d'eau physiologique citratée. Dans le deuxième, on fait passer un courant de gaz d'éclairage et de CO².

TABLEAU VI.

HEURES	VASE TÉMOIN	VASE D'EXPÉRIENCE
11,45 . .	Commencement de l'expérience.	
11,50 . .	Gamètes arrondis.	Pas de changement.
11,55 . .	Microgamètes et fécondation.	Quelques gamètes arrondis.
12,07 . .	Microgamètes et fécondation.	Microgamètes incomplètement exflagellés encore fixés au microgamétocyte.
12,15 . .	Microgamètes et fécondation.	Arrêt de CO et CO ² . Gamètes arrondis rares.
12,23 . .	Microgamètes et fécondation.	Pas de changement.
12,40 . .	Microgamètes et fécondation.	Pas de changement.
12,50 . .	Microgamètes et fécondation.	Pas de changement.
48 plus tard.	Oocinètes.	Pas d'oocinètes.

L'action de CO maintenue vingt minutes semble trop forte, pour aller plus vite on élève la température du milieu jusqu'à 41°.

TABLEAU VII.

HEURES	TÉMOIN	CO + CO ²	A L'AIR
16,35 . .	Commencement de l'expérience.		
16,37 . .	Gamètes et fécondation.	0	On extrait 11 gouttes en verre de montre.
16,40 . .	Gamètes et fécondation.	0	0
16,47 . .	Gamètes et fécondation.	0	0
16,53 . .	Gamètes et fécondation.	0	Quelques gamètes arrondis.
17,03 . .	Gamètes et fécondation.	0	Microgamètes et fécondation.
48 plus tard.	Oocinètes.		Pas d'oocinètes.

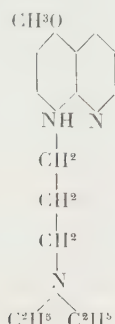
Nous voyons que les choses se passent comme nous l'avions supposé. L'influence fâcheuse du gaz d'éclairage n'est pas niable, mais ce gaz, à condition qu'il agisse un temps assez court, permet à l'exflagellation, il est vrai incomplète, de s'accomplir même en présence de CO². Par son pouvoir de fixation énergique d'une part, il constitue un écran entre le gaz d'arrêt et le globule renfermant le parasite, et, d'autre part, par mélange avec CO², il ne permet pas toujours au pH de s'abaisser au niveau qui maintient l'immobilité des gamètes.

IX. — INFLUENCE DES REMÈDES ANTIPALUSTRES

Les frères Sargent [20] ont depuis longtemps fait connaître le pouvoir microbicide de la quinine vis-à-vis des parasites des oiseaux. D'autre part, Warrington Yorke et Macfie [23] et plus récemment S. P. James [11] ont observé que la quinine ne semble pas active contre les sporozoïtes.

Ce dernier auteur a reconnu, au contraire, que la plasmoquine était douée d'une remarquable toxicité pour les parasites fusiformes provenant du moustique. Les frères Sargent ont fait la même observation à propos d'un produit fabriqué par notre

collègue Fourneau et désigné par lui sous le n° 710. La formule de ce corps peut s'écrire comme suit.



Nous avons recherché si, vis-à-vis du processus de fécondation, les mêmes produits jouissent d'un pouvoir quelconque. A cet égard, nous avons procédé à un certain nombre d'expériences.

Chlorhydrate de quinine. — La solution de quinine est préparée dans l'eau physiologique citratée qui nous a servi pour nos autres expériences. Pour chaque expérience, une certaine quantité de sang de pigeon a été additionnée d'une quantité égale de solution. Le titre des deux solutions réunies était le suivant :

Solution à 0,000.01 . . .	Fécondation.	Oocinètes.
Solution à 0,000.05 . . .	Fécondation.	Oocinètes.
Solution à 0,000.1 . . .	Fécondation.	Pas d'oocinètes.
Solution à 0,005 . . .	Exflagellation. Pas de fécondation.	Pas d'oocinètes.
Solution à 0,003 . . .	Exflagellation rare et incomplète.	Pas d'oocinètes.
	Arrêt rapide des microgamètes.	
Solution à 0,001 . . .	Gamètes s'arrondissent et tout s'arrête.	Pas d'oocinètes.

Cette expérience nous montre que les phénomènes de la fécondation sont scindés par le produit toxique. Les stades ultimes sont arrêtés les premiers et les autres se suspendent successivement, jusqu'au premier; l'arrondissement des gamètes persiste encore avec une solution à 1 p. 1.000.

Plasmoquine et 710 Fourneau. — La plasmoquine se présente sous l'étiquette de plasmoquine simple « N-diéthylaminopentyl-

8-amino-6-métoxyquinoléine » et de plasmoquine composée qui est le même produit additionné de chlorhydrate de quinine dans la proportion de 0 gr. 60 de celui-ci pour 0 gr. 02 de plasmoquine.

Le produit n° 710 de notre collègue Fourneau est sensiblement le même dans lequel le pentyl est remplacé par le propyl. Les résultats sont les suivants :

TABLEAU VIII.

DILUTION	PLASMOQUINE	PLASMOQUINE COMPOSÉE	710
1/1.000	0	0	0
1/2.000	0	0	0
1/3.000	0	0	0
1/4.000	0	0	Gamètes arrondis.
1/5.000	Gamètes arrondis.		Fécondation très irrégulière.
1/6.000	Fécondation irrégulière et tardive.	Fécondation très irrégulière.	Fécondation très irrégulière.
1/7.500	Fécondation irrégulière et tardive.	Fécondation très irrégulière.	Fécondation très irrégulière.
1/10.000	Fécondation irrégulière et tardive.	Fécondation très irrégulière.	Fécondation presque normale.
1/20.000	Fécondation normale.	Fécondation normale.	Fécondation normale.
1/40.000	Fécondation normale.	Fécondation normale.	Fécondation normale.
1/100.000	Oocinètes rares.	Oocinètes rares.	Oocinètes nombreux.
1/200.000	Oocinètes nombreux.	Oocinètes rares.	Oocinètes nombreux.
1/500.000	Oocinètes nombreux.		

Nous voyons en somme par le tableau précédent que l'action sur les phénomènes de fécondation des trois produits plasmoquine simple, plasmoquine composée et 710 Fourneau, est sensiblement la même. Il faut arriver jusqu'à une dilution de 1/200.000 pour que ceux-ci se comportent normalement.

CONCLUSIONS

Des recherches qui viennent d'être exposées nous pouvons conclure :

1° La fécondation d'*H. orizivora* s'accomplit de 13° à 43°, la température optima étant 36°.

2° Les oocinètes se forment bien à 20-23°. Ils dégénèrent à 37°.

3° La concentration du liquide n'est, pas plus que le refroidissement, l'agent moteur de la fécondation. L'addition de chlorure de sodium en solutions très faibles ou très fortes est un agent d'arrêt. Cependant une concentration de 1 p. 100 n'apporte aucune gêne;

4° L'oxalate de potassium et le citrate de sodium en solution dans l'eau physiologique permettent la fécondation régulière dans le sang conservé non coagulé. Les doses optima sont 1 p. 100 d'oxalate, 1,5 p. 100 de citrate dans l'eau physiologique à 0,5 p. 100 de NaCl;

5° C'est le CO_2 du sang qui est l'agent freinateur. La fécondation se met en route quand CO_2 se dégage, à condition que l'action de ce gaz n'ait pas été trop longtemps prolongée;

6° Le dégagement de CO_2 fait passer le pH sanguin de 7,38 à 7,75 en cinq minutes;

7° Le pH sanguin normal du pigeon est 7,34-7,35; à ce titre la fécondation est suspendue; à 7,55 elle se produit;

8° L'injection de solutions alcalines ne modifie que très peu le pH sanguin;

9° Le CO_2 n'agit que par l'abaissement et le maintien du taux du pH sanguin;

10° On peut exercer la même action avec d'autres acides;

11° La fécondation se produit en l'absence relative d'oxygène et dans une atmosphère d'hydrogène;

12° Le gaz d'éclairage par son affinité pour l'hémoglobine chasse l'oxygène. Si l'action en est courte, elle n'apporte aucune entrave à la fécondation, si elle se prolonge la fécondation est sinon totalement arrêtée, au moins gênée et s'arrête en route;

13° Le chlorhydrate de quinine arrête la fécondation à 1/10.000 et l'interdit presque totalement à 1/1.000.

14° La plasmoquine et le 710 Fourneau arrêtent également la fécondation à 1/10.000 et l'interdisent à 1/4.000.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Helen ADIE, The sporogony of *H. columbæ*. *Ind. Med. Journ. of Med. Res.* Janvier 1915 et *Bul. de la Soc. Path. Exot.*, juillet 1924.
- [2] ANSCHÜTZ, Ueber den Entwicklungsgang der *Hæmoproteus oryzivora*, n. sp. *Cent.f. Bakt. orig.*, 51, p. 654.

- [3] DE BEAUREPAIRE ARAGAO, Sobre o cyclo evolutivo del halteridio del pombo. *Braz. med.*, 1907.
- [4] DE BEAUREPAIRE ARAGÃO, Ueber de Entwicklungsgang und die Uebertragung von *Hæmoproteus columbæ*. *Arch. f. Protist.*, **13**, 1908, p. 154.
- [5] CLAUS, Ueber den Einfluss physikalischer Reize auf die Bildung der Geschlechtszellen bei *Hæmoproteus*. *Hyg. Rund.*, n° 6, 1903.
- 6 CULLEN (G. E.), The colorimetric determination of the Hydrogenion concentration of blood plasma. *Journ. of Biol. Chem.*, **52**, 1922, p. 501-515.
- [7] DALE et EVANS, Carbon dioxyde and circulation. *Journ. of Physiol.*, **56**, 1922, p. 125.
- [8] DANILEWSKY, Matériaux pour servir à la parasitologie du sang. *Archives slaves de Biologie*. Paris 1886.
- [9] GONDER, Zur Uebertragung von *Hæmoproteus columbæ*. *Arch. f. Protist.*, **10**, 1915, p. 139.
- [10] HAWKINS (Z. A.), A micromethod for the determination of the hydrogenion concentration of whole blood. *Journ. Biol. chem.*, **57**, 1923, p. 493-495.
- 11 S. P. JAMES, Some General results of a study of induced malaria in England. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.*, **24**, n° 5, p. 477-538; — S. P. JAMES, W. D. NICOL and P. G. SCHUTE, On the prevention of Malaria with Plasmoquine. *Lancet*, 15 août 1934.
- [12] KRAUSE, Ueber Blutparasiten. *Virchows Arch.*, **121**, p. 359.
- [13] LABBÉ, Parasites endoglobulaires du sang des vertébrés. *Thèse de Paris*, 1894 et *Sporozoa der Tierreich*, fasc. 5, Berlin 1894.
- [14] MC CALLUM. *Journ. of exper. med.*, **3**, 1898.
- [15] MARCHOUX. *C. R. Soc. de Biol.*, 11 mars 1899.
- [16] NEGRI, Beobachtung über *Hæmoproteus*. *Cent. f. Bakt.*, 1 Abt. **68**, 1901, p. 599.
- [17] NÖLLER. *Cent. f. Bakt. orig.*, **41**, 1920.
- [18] SCHAUDINN, Generations und Wirtswech. *Kaiserl. Gesund.*, **20**, fasc. 3, p. 387.
- [19] Ed. et Et. SERGENT, Sur le second hôte de l'*Hæmoproteus* du pigeon. *Ces Annales*, **21**, 1906, p. 251.
- [20] Ed. et Et. SERGENT, Avantages de la quininisation préventive démontrés et précisés expérimentalement. *Ces Annales*, **35**, février 1921, p. 125-141.
- [21] VERAÏN et CHAUMETTE, Le pH en Biologie, Masson, Paris, 1930.
- [22] VON WASIELEWSKI et WÜLKER, Die *Hæmoproteus*, Infection des Turmfalken. *Arch. f. Schif. und Trop. Hyg.* beiheft, **2**, 1918.
- [23] WARRINGTON YORKER et J. W. S. MACFIE, Observations on malaria made during treatment of general paralysis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.*, **8**, nos 1-2, 20 mars-15 mai 1924, p. 13-33.

SUR L'IMMUNISATION PASSIVE CONTRE LE TÉTANOS PAR LA VOIE CUTANÉE

par ACHILLE URBAIN.

L'immunisation passive contre le tétanos par la voie cutanée a été envisagée dès 1903 par A. Calmette (1). A l'aide de ciseaux, il pratiquait chez le cobaye, sur le dos ou à la cuisse, une plaie pénétrante, en boutonnière, intéressant toute l'épaisseur du derme; il la saupoudrait de poussière de balayage, mélangée avec un peu de terre et copieusement imprégnée de spores tétaniques. Alors que les cobayes témoins succombaient tous au tétanos, les animaux chez lesquels les plaies, légèrement avivées, étaient saupoudrées de sérum antitétanique sec survivaient tous.

Plus récemment, Besredka et Nakagawa [1927] (2), dans un ordre d'idées différent, notamment pour étendre le principe de la vaccination locale à l'immunité passive, ont entrepris des recherches sur la toxine et l'antitoxine tétaniques. Se basant sur les résultats de la vaccinothérapie locale, obtenus avec le staphylocoque et le streptocoque, ces auteurs se sont demandé si vis-à-vis des microbes toxigènes et leur toxine il n'y aurait pas un mécanisme de défense locale comparable. Leurs recherches ont porté sur la toxine tétanique. Ils ont constaté que le sérum antitétanique, appliqué sur la peau rasée, vingt-quatre heures avant la toxine, préserve le cobaye contre les accidents toxiques. Appliqué, une à trois heures, après la toxine, le pansement antitétanique protège contre le tétanos mortel, sans empêcher quelquefois des troubles tétaniques passagers. Employé en pansement, sous forme liquide, le sérum agit surtout sur la toxine tétanique se trouvant dans l'aire du pansement, c'est-à-dire, localement; sous forme de crème, le sérum peut agir, en plus, sur la toxine injectée à distance. En aucun cas, le sérum

(1) *C. R. Acad. Sciences*, **136**, 11 mai 1903, p. 1150.

(2) *Ces Annales*, juin 1927, p. 607.

employé en pansement ne peut provoquer des accidents anaphylactiques.

Nous basant sur ces travaux, nous avons entrepris un certain nombre de recherches dans le but de préciser les taux de sérum antitétanique à incorporer dans le mélange de lanoline-vaseline pour préserver sûrement le cobaye contre le tétanos expérimental.

Dans une première série d'expériences, nous avons utilisé la toxine tétanique; dans une deuxième série, les spores tétaniques associées à des staphylocoques.

Toutes nos recherches ont été effectuées sur des cobayes, avec une crème constituée par le mélange : vaseline : 1 partie, lanoline : 3 parties, auquel il était additionné du sérum antitétanique purifié renfermant 3.000 unités antitoxiques internationales par 10 cent. cubes; à des taux variables (2,5; 5; 10 ou 15 p. 20). Cette crème était appliquée, en pansement, durant dix-huit heures, sur la peau du ventre préalablement rasée et légèrement scarifiée.

PREMIÈRE EXPÉRIENCE. — Elle a porté sur 20 cobayes; 4 ont été pansés à la crème contenant 2,5 p. 20 de sérum antitétanique; 4 avec la crème à 5 p. 20; 4 avec la crème à 15 p. 20; les 4 derniers (témoins) ont simplement reçu le mélange lanoline + vaseline, sans sérum. Le lendemain, les pansements ont été enlevés et l'on injecta à tous les cobayes, sous la peau du ventre, une dose mortelle de toxine tétanique (1/80.000 de centimètre cube d'une toxine provoquant à 1/100.000 des accidents tétaniques locaux souvent mortels).

Trois jours après, les 4 témoins et les 4 cobayes traités avec la même crème à 2,5 p. 20 de sérum présentent de la raideur accusée des membres postérieurs; mis sur le dos, ils ont de la peine à se relever. Les symptômes tétaniques s'aggravent les jours suivants, avec plus de rapidité chez les témoins. Tous les témoins meurent (en six-sept jours); des animaux pansés, 2 succombent en dix jours; 1 en treize jours; 1 autre se rétablit.

Les animaux traités avec des crèmes à 5, 10 et 15 p. 20 ne présentent aucun signe de tétanos.

Cette expérience montre donc que les cobayes soumis à l'action d'une crème antitétanique renfermant au moins 5 p. 20 de sérum antitétanique purifié résistent à l'injection de la toxine tétanique pratiquée le lendemain.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Seize cobayes reçoivent le 10 décembre un pansement à la crème renfermant 15 p. 20 de sérum antitétanique; le lendemain, 4 sont éprouvés, sous la peau de ventre, avec 1/10.000 de centimètre cube de toxine tétanique; 4 avec 1/20.000; 4 avec 1/40.000; 4 avec 1/80.000 de la même toxine. 4 cobayes témoins reçoivent aussi 1/80.000 de toxine tétanique.

Les 4 cobayes qui ont reçu 1/10.000 de toxine présentent de la raideur le 13 décembre; celle-ci s'accroît les jours suivants; 2 meurent le 20; 1 autre le 23; le quatrième se rétablit.

Sur les 4 cobayes éprouvés avec 1/20.000 de centimètre cube de toxine tétanique 1 seul présente de la raideur passagère le 14 et le 15 décembre.

Les cobayes ayant reçu 1/40.000 ou 1/80.000 de toxine n'ont rien présenté d'anormal.

Les cobayes témoins ont tous présenté de la raideur tétanique les 13 et 14 décembre; ils ont succombé le 19 et 20 décembre à l'intoxication tétanique.

Cette expérience confirme la précédente; en plus, elle souligne ce fait : les cobayes qui reçoivent un pansement antitétanique ne résistent qu'à 3 à 4 doses mortelles de toxine tétanique.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Cette troisième expérience a porté sur 10 cobayes, 4 ont été pansés avec une crème renfermant 15 p. 20 de sérum antitétanique; 4 autres ont été traités avec une crème contenant 15 p. 20 de sérum antidiphthérique; les 2 derniers n'ont pas été pansés. Tous ces animaux ont reçu le lendemain 1/60.000 de centimètre cube de toxine tétanique sous la peau du ventre; quatre jours plus tard, les 2 témoins et les 4 cobayes ayant été traités par le sérum antidiphthérique, présentent de la raideur; celle-ci s'accroît les jours suivants; tous les animaux meurent en dix à quatorze jours de tétanos.

Les 4 cobayes pansés au sérum antitétanique n'ont rien présenté d'anormal.

Ces résultats sont donc une nouvelle confirmation des expériences précédentes : alors que la crème à l'antitoxine tétanique protège les cobayes contre l'injection de toxine tétanique, l'application d'un pansement au sérum antidiphthérique reste sans action.

QUATRIÈME EXPÉRIENCE. — Vingt cobayes sont inoculés sous la peau du ventre avec 1/60.000 de centimètre cube de toxine tétanique.

Des pansements avec une crème renfermant 15 p. 20 de sérum antitétanique sont appliqués sur le ventre des cobayes, une heure, trois heures, six heures, douze heures, après la toxine.

L'expérience a été conduite de la façon suivante :

25 novembre 1934. — Lot 1 : 4 cobayes (nos 30, 31, 32, 33) sont pansés une heure après l'injection de la toxine tétanique.

Lot 2 : 4 cobayes (nos 34, 35, 36, 37) sont pansés trois heures après l'injection de la toxine.

Lot 3 : 4 cobayes (nos 37, 38, 39, 40) sont pansés six heures après l'injection de la toxine tétanique.

Lot 4 : 4 cobayes (nos 41, 42, 43, 44) sont traités douze heures après l'injection de la toxine.

Lot 5 : 4 cobayes (nos 45, 46, 47, 48) ne reçoivent aucun pansement.

Les résultats obtenus ont été les suivants : 2 cobayes (n° 45 et 37) sont morts d'infection secondaire au cours de l'expérience.

Les cobayes des lots 1 et 2, c'est-à-dire ceux pansés une et trois heures après l'administration de la toxine, sont restés indemnes ; les animaux des lots 3, 4 et 5 ont présenté dès le quatrième jour (29 novembre) de la raideur accusée ; ces signes s'accroissent rapidement : tous les animaux succombent au tétanos en douze à quinze jours, à l'exception du cobaye n° 38 qui se rétablit.

Il ressort donc de cette expérience que le pansement à la crème antitétanique, comme l'ont constaté Besredka et Nakagawa, exerce un certain effet curatif lorsqu'il est appliqué trois heures après l'injection de la toxine. Après six heures son action est nulle.

*
* *

Dans une deuxième série d'expériences, nous avons substitué, à la toxine tétanique, des spores tétaniques additionnées d'une émulsion épaisse de staphylocoques. A cet effet, 10 cent. cubes d'une culture de bacilles tétaniques, en bouillon, âgée de six jours, sont centrifugés. On décante le liquide surnageant et on le remplace par une quantité égale d'eau physiologique. On secoue énergiquement, on centrifuge à nouveau, on rejette le liquide surnageant et on le remplace par un égal volume d'eau physiologique. Cette opération est renouvelée deux ou trois fois. Après la dernière décantation, le culot obtenu est émulsionné dans 10 cent. cubes d'eau physiologique. A cette émulsion de spores tétaniques, on ajoute 20 cent. cubes d'une culture abondante de staphylocoques en bouillon. C'est ce mélange de spores tétaniques, ainsi débarrassées, par lavage, de toxine, qui est utilisé. Nous avons recherché si la crème au sérum antitétanique était susceptible de protéger le cobaye contre l'inoculation de ce mélange, au même titre qu'elle le préserve contre l'injection de toxine tétanique.

CINQUIÈME EXPÉRIENCE. — Dix cobayes reçoivent sur la peau du dos préalablement rasée et scarifiée un pansement avec une crème renfermant 45 p. 20 de sérum antitétanique.

Dix cobayes sont pansés de la même façon avec une crème contenant 15 p. 100 de sérum normal.

Dix-huit heures après, ces animaux reçoivent, sur le dos au niveau de la région pansée, sur des scarifications profondes, le mélange staphylocoque + spores tétaniques.

Quatre cobayes, témoins, non pansés, sont traités de la même façon.

Les résultats obtenus sont les suivants : cinq jours après l'inoculation des spores tétaniques, les 4 témoins et les 10 animaux pansés à la crème au sérum normal présentent de la raideur et des contractures des muscles des membres. Dans les cinq jours qui suivent, les symptômes tétaniques augmentent et le huitième jour après l'inoculation tous les cobayes ont succombé au tétanos expérimental. Par contre, les animaux traités à la crème antitétanique ont tous résisté, 2 d'entre eux ont cependant présenté un peu de raideur des membres postérieurs le huitième jour qui a suivi l'inoculation; ils se sont rétablis ensuite.

Cette expérience est donc superposable à celle effectuée avec la toxine tétanique; les cobayes soumis à l'action de la crème antitétanique résistent à l'inoculation expérimentale d'un mélange de spores et de staphylocoques qui provoque en cinq jours, chez les témoins, un tétanos mortel.

SIXIÈME EXPÉRIENCE. — Trente cobayes reçoivent sur des scarifications cutanées étendues le mélange spores tétaniques + staphylocoques. Des pansements avec une crème antitétanique sont appliqués, au niveau des scarifications, une heure, trois heures, six heures, dix-huit heures, vingt-quatre heures, après l'inoculation.

Voici le protocole de cette expérience :

Lot 1 : 5 cobayes (nos 2, 3, 4, 5, 6) sont pansés une heure après l'inoculation.

Lot 2 : 5 cobayes (nos 7, 8, 9, 10, 11) sont pansés trois heures après l'inoculation.

Lot 3 : 5 cobayes (nos 12, 13, 14, 15, 16) reçoivent un pansement six heures après l'inoculation.

Lot 4 : 5 cobayes (nos 17, 18, 19, 20, 21) sont traités à la crème antitétanique dix-huit heures après leur infection.

Lot 5 : 5 cobayes (nos 22, 23, 24, 25, 26) sont pansés vingt-quatre heures après l'inoculation.

Lot 6 : 5 cobayes (nos 27, 28, 29, 30, 31), non pansés (témoins).

Les résultats obtenus furent les suivants : les cobayes 21, 7 et 13 succombent d'infections secondaires au cours de l'expérience.

Les cobayes du lot 6 (témoins), les nos 22, 23 du lot 5, le no 21 du lot 4, présentent de la contracture tétanique des membres postérieurs au bout du sixième jour. Le septième jour, tous les animaux des lots 6, 5 et 4 présentent de la raideur accusée des membres: le no 16 du lot 2 a aussi de légers symptômes tétaniques.

Les accidents tétaniques s'aggravent ensuite très rapidement chez les cobayes atteints : tous les animaux témoins succombent entre le neuvième et dixième jour ainsi que les nos 22, 23 et 25 du lot 5 et les nos 17 et 18 du lot 4. Les autres cobayes atteints se rétablissent dans la suite.

Quant aux animaux des lots 1 et 2 et les nos 13, 14 et 15 du lot 3, ils restent indemnes.

Ces expériences prouvent donc que le pansement au moyen d'une crème antitétanique est susceptible d'exercer un effet

curatif alors même qu'il est appliqué six heures après l'inoculation des spores tétaniques.

Après dix-huit heures son action est nulle.

SEPTIÈME EXPÉRIENCE. — Dans cette expérience, nous avons recherché si l'adjonction à la crème antitétanique d'antivirus strepto-staphylococcique ne pouvait exercer une action adjuvante utile, en empêchant *in situ* l'infection staphylococcique et en permettant ainsi une phagocytose plus intense des spores tétaniques. Nous avons utilisé, à cet effet, une crème renfermant pour 20 parties d'excipient, 15 cent. cubes de sérum antitétanique et 5 cent. cubes d'antivirus.

Notre expérience a été conduite de la façon suivante : 20 cobayes reçoivent sur des scarifications cutanées de la région du dos le mélange spores tétaniques et staphylocoques. Des pansements à la crème antitétanique + antivirus sont ensuite appliqués, sur les scarifications, trois heures, six heures, dix-huit heures, vingt-quatre heures après l'inoculation. Voici le protocole de cette expérience :

Lot 1 : 4 cobayes (n^{os} 32, 33, 34, 35) sont pansés trois heures après l'inoculation.

Lot 2 : 4 cobayes (n^{os} 36, 37, 38, 39) reçoivent un pansement six heures après l'injection.

Lot 3 : 4 cobayes (n^{os} 40, 41, 42, 43) sont pansés dix-huit heures après l'inoculation.

Lot 4 : 4 cobayes (n^{os} 44, 45, 46, 47) sont traités vingt-quatre heures après l'inoculation.

Lot 5 : 4 cobayes (n^{os} 48, 49, 50, 51) non pansés (témoins).

Au cours de l'expérience, les cobayes n^{os} 40 et 44 meurent d'infections secondaires.

Les résultats enregistrés furent les suivants : le sixième jour, après l'injection, les cobayes du lot 5, les n^{os} 45, 46 du lot 4, le n^o 43 du lot 3, présentent des contractures et de la raideur des membres. Le septième jour, le n^o 47 du lot 4 et le n^o 42 du lot 3 ont aussi des symptômes tétaniques. Ces symptômes s'aggravent assez rapidement chez les témoins qui meurent tous entre le dixième et douzième jour; les n^{os} 45 et 46 du lot 4, le n^o 43 du lot 4 succombent aussi le quinzième jour. Les n^{os} 47 et 42 survivent.

Restent indemnes les animaux des lots 1 et 2 et le n^o 41 du lot 3.

Cette expérience confirme donc les résultats précédents; le pansement au moyen de la crème antitétanique + antivirus paraît cependant avoir eu une action un peu plus active que la crème contenant du sérum antitétanique seul, puisque un des cobayes pansés dix-huit heures après l'infection n'a pas présenté de contractures tétaniques (1). D'autre part, la présence

(1) Cette expérience renouvelée deux fois, dans les mêmes conditions, nous a toujours donné des résultats concordants, un certain nombre de cobayes (1 sur 3, 2 sur 5) pansés dix-huit heures après l'infection, n'ont pas présenté de symptômes tétaniques.

de l'antivirus dans la crème provoque une cicatrisation rapide des plaies de scarifications.

*
* *

En résumé, il résulte de nos recherches ceci :

1° La crème contenant au moins 5 p. 20 de sérum antitétanique, appliquée en friction sur la peau, dix-huit à vingt-quatre heures avant la toxine, crée à ce niveau une immunité locale permettant de préserver le cobaye contre l'inoculation de 3 à 4 doses mortelles de toxine tétanique ;

2° Appliqué, trois heures après la toxine, le pansement à la crème antitétanique protège le cobaye contre l'injection d'une dose mortelle de toxine tétanique ;

3° La crème contenant 15 p. 20 de sérum antitétanique employée en pansement sur la peau rasée et scarifiée des cobayes, dix-huit à vingt-quatre heures avant l'inoculation d'un mélange de spores tétaniques et de staphylocoques, protège ces animaux contre le tétanos mortel ;

4° Chez le cobaye, le pansement à la crème antitétanique est susceptible d'exercer un effet curatif, à la condition d'être appliqué trois à six heures après l'inoculation des spores tétaniques ;

5° L'adjonction d'antivirus staphylo-streptococcique à la crème antitétanique semble favoriser son action antitoxique.

(Institut Pasteur.)

ETUDE DE L'INFLUENCE DE L'ALUMINIUM SUR LE *STERIGMATOCYSTIS NIGRA*

par M^{me} GEORGETTE LÉVY.

Dans un travail antérieur [1 et 2] nous avons constaté que l'aluminium existait chez toutes les plantes phanérogames en proportions variées selon les espèces et les organes considérés. Il est un constituant de la matière végétale, on le trouve en quantités voisines et même quelquefois supérieures à celles du fer.

Il m'a paru intéressant d'étudier le rôle que pouvait jouer l'aluminium sur le développement des végétaux inférieurs. Raulin [3] n'en introduit pas dans son liquide nutritif, cependant cet élément répandu dans presque tous les sols est peut-être susceptible de jouer un rôle prépondérant dans la vie des végétaux.

Utilisant le *Sterigmatocystis nigra* j'ai fait des séries de cultures sur des milieux contenant de l'aluminium, étudiant l'action qu'exercent de très faibles quantités de ce métal, puis des doses de plus en plus élevées.

Préparation des milieux de culture et leur purification.

Pour toutes ces expériences c'est le milieu de culture type, indiqué par G. Bertrand [4] qui a été utilisé. Il est ainsi constitué :

Eau pure redistillée dans le vide.	200
Nitrate d'ammonium	0,60
Phosphate d'ammonium	0,08
Sulfate d'ammonium	0,04
Sulfate de magnésium	0,17
Alun de fer.	0,0172
Sulfate de zinc	0,0088
Sulfate de manganèse	0,004
Carbonate de potassium	0,08
Saccharose	9,00
Acide tartrique	0,53

PURIFICATION. — Cette solution nutritive a été autant que possible privée de toute trace d'aluminium.

Les sels employés ont été vérifiés séparément avant d'être dissous dans l'eau. On a effectué un dosage d'aluminium 5^e sur une grande quantité de chaque sel: si l'un d'eux fournissait un précipité ou seulement un louche de phosphate d'aluminium, il était rejeté ou purifié par recristallisation et ensuite vérifié à nouveau. L'eau utilisée était de l'eau redistillée sous pression réduite. Les milieux de culture ainsi que tout le matériel ont été stérilisés à l'autoclave à 120°.

MATÉRIEL UTILISÉ. — Les cultures ont été faites dans les petites cuvettes cylindriques proposées par G. Bertrand. Elles sont d'un maniement commode et offrent le maximum de sécurité.

CONDITIONS DE CULTURE. — Les cultures ont été largementensemencées avec un fil de platine flambé. Les conidies ont été chaque fois prélevées sur des cultures effectuées sur un milieu privé d'aluminium.

Les cultures placées dans un thermostat bien aéré, maintenu à 35°, ont été recueillies en général le sixième jour, puis lavées à l'eau distillée et séchées à l'étuve entre deux papiers filtre jusqu'à poids constant. Les expériences ont été faites deux fois en présence de plusieurs témoins et chaque échantillon figurait au moins en double et le plus souvent en triple afin d'éviter les causes d'erreurs dues aux variations individuelles des cultures.

Les poids de matière sèche ont été obtenus en prenant la moyenne des poids des différents échantillons de chaque essai.

Au début des expériences il a été vérifié que le milieu de culture était favorable au bon développement du *Sterigmato-cystis nigra*, puis dans le même milieu on introduit de l'aluminium. Le sel utilisé était du sulfate d'aluminium pur et recristallisé.

Les premières doses introduites sont extrêmement faibles (0 milligr. 001 par milieu de culture de 200 cent. cubes), puis passant par tous les stades on introduit des doses de plus en plus élevées allant jusqu'à 1.500 milligrammes par litre de liqueur nutritive.

Les résultats consignés dans les tableaux suivants sont exprimés pour l'aluminium en milligrammes d'aluminium introduits par milieu de culture de 200 cent. cubes de solution nutritive, sous forme de sulfate d'aluminium. Le poids de matière sèche est exprimé en grammes de matière sèche pour une culture.

TABLEAU I. — Résultats obtenus.

ALUMINIUM introduit en milligrammes pour 200 cent. cubes de solution nutritive	POIDS DE MATIÈRE SÈCHE en grammes par milieu de culture
Témoins sans aluminium	2,77
0,004	2,65
0,005	2,65
0,010	2,64
0,025	2,67
0,050	2,65
0,100	2,74

Les cultures ont eu une évolution normale, le mycélium était bien constitué, épais et ferme. La germination qui a commencé le troisième jour s'est développée rapidement, et les conidies étaient abondantes et très noires.

De très petites quantités d'aluminium de l'ordre 0 milligr. 001 à 0 milligr. 1 n'agissent donc pas sur le développement du *Sterigmatocystis nigra*.

TABLEAU II.

ALUMINIUM introduit en milligrammes pour 200 cent. cubes de solution nutritive	POIDS DE MATIÈRE SÈCHE en grammes par milieu de culture
Témoins sans aluminium	2,70
0,1	2,67
0,25	2,73
0,50	2,70
1	2,62
2,5	2,71
5	2,60

Comme les précédentes les cultures du tableau II sont bien développées, aucun retard ne s'est manifesté par rapport aux témoins. L'aluminium introduit dans le milieu de culture en très faibles doses ne semble pas exercer d'action sur le développement du *Sterigmatocystis nigra*.

Les travaux de G. Bertrand sur le manganèse ont démontré que cet élément est indispensable à la vie du *Sterigmatocystis* et que les concentrations suffisantes en ce métal étaient de 1/10.000.000.000. Si l'aluminium joue un rôle comparable à celui du manganèse, s'il a une activité catalytique à des doses infinitésimales, les méthodes actuelles capables de déceler sûrement l'aluminium sont insuffisantes pour une telle détermination. L'introduction dans le milieu de culture de 0 milligr. 001 d'aluminium n'exerce aucune action. Si donc ce métal a un rôle indispensable pour les fonctions vitales du *Sterigmatocystis*, c'est pour des concentrations infimes au-dessous de 0 milligr. 005 par litre de solution nutritive.

Pour les doses comprises entre 0 milligr. 001 et 5 milligrammes par milieu de culture il ne se produit aucun changement dans le développement des cultures, ces doses ne favorisent pas le développement du *Sterigmatocystis*, et on n'observe pas non plus le « coup de fouet » dont parle Hébert [6], aucune action nocive n'est constatée.

TABLEAU III.

ALUMINIUM introduit en milligrammes pour 200 cent. cubes de solution nutritive	POIDS DE MATIÈRE SÈCHE en grammes par milieu de culture
Témoins sans aluminium	2,65
10	2,62
25	2,67
50	2,40
100	0,350
200	Néant.
300	Néant.

Cette troisième série donne des résultats caractéristiques :
Les témoins sont bien développés.

Les cultures dans lesquelles on a introduit 10 milligrammes d'aluminium se développent bien. Celles qui contiennent 25 milligrammes ont un poids de matière sèche voisin de celui des cultures témoins, mais la sporulation se produit avec un léger retard (une demi-journée) et les conidies sont moins abondantes.

Les milieux contenant 50 milligrammes d'aluminium ont un

rendement encore élevé, le mycélium est bien développé, mais la culture est à peine sporulée, il n'apparaît au bout de six jours que quelques conidies grises à sa surface. L'introduction de 100 milligrammes d'aluminium dans le milieu de culture provoque un changement total, le poids de matière sèche est très faible, le mycélium est mince et constitué par des îlots disséminés. Il n'y a plus du tout de conidies.

Les milieux de culture dans lesquels on avait introduit 200 et 300 milligrammes d'aluminium se sont montrés tout à fait inaptes à la culture du *Sterigmatocystis*. Au bout de six jours à la surface du liquide, il n'y a que les conidies qui ont servi à l'ensemencement.

Le *Sterigmatocystis nigra* est capable de se développer dans un milieu contenant jusqu'à 50 milligrammes d'aluminium, c'est-à-dire dans une solution nutritive contenant encore 250 milligrammes d'aluminium par litre. Pour des doses plus élevées les cultures sont mal développées, le rendement en matière sèche est très diminué et la sporulation ne se fait plus.

Afin de préciser la limite de concentration en aluminium au-dessus de laquelle le poids de récolte se trouve notablement abaissé, il a été fait encore des séries de cultures en présence de doses d'aluminium voisines de la limite nocive.

TABLEAU IV.

ALUMINIUM introduit en milligrammes pour 200 cent. cubes de solution nutritive	POIDS DE MATIÈRE SÈCHE en grammes par milieu de culture
Témoins sans aluminium	2,64
10	2,59
20	2,65
25	2,60
40	2,66
60	2,20
80	1,70

Cette quatrième série de cultures (tableau IV) confirme bien la troisième série, c'est entre 40 et 60 milligrammes d'aluminium par milieu de culture que le développement du *Sterigmatocystis* devient mauvais.

La courbe ci-dessous montre bien la chute du poids des récoltes, lorsque la teneur en aluminium a atteint puis dépassé la dose limite. On peut donc conclure que l'aluminium n'agit pas sur le développement du *Sterigmatocystis nigra* jusqu'à

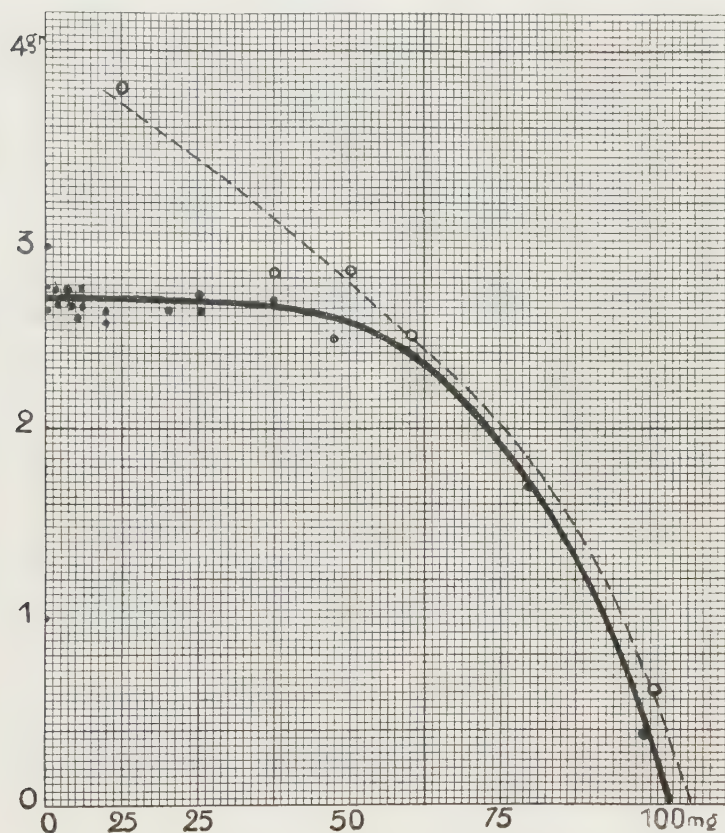


FIG. 1. — Courbe de variation du poids sec de la récolte en fonction des teneurs en aluminium du milieu de culture.

1° En trait plein, courbe obtenue en faisant varier la concentration en sulfate d'aluminium;

2° En trait interrompu, courbe obtenue en faisant varier la teneur en aluminium tout en laissant constante la teneur en radicale (SO_4).

la dose énorme de 50 milligrammes par milieu de culture (soit 250 milligrammes par litre de solution nutritive). Au-dessus de cette dose on constate :

1° Un retard de la sporulation ; 2° la suppression des conidies ; 3° la diminution du mycélium ; 4° l'absence totale de germination.

Vérification de l'action spécifique de l'aluminium.

1° INFLUENCE DE L'ION SULFURIQUE SUR LA CROISSANCE DU *Sterigmatocystis nigra*.

Dans les expériences précédentes, l'aluminium est introduit dans les milieux de culture sous forme de sulfate d'aluminium $(\text{SO}^4)^3\text{Al}^3$.

Pour augmenter les doses d'aluminium il faut introduire dans la solution nutritive des quantités de sels assez élevées qui changent considérablement la concentration du milieu. Il faut aussi noter qu'on n'introduit pas seulement de l'aluminium mais aussi de fortes quantités d'ions SO^4 . Il se pourrait que l'intoxication observée ne provienne pas de l'action spécifique de l'aluminium, mais qu'elle soit due à la présence dans le milieu de culture de trop grandes quantités d'ions SO^4 .

Afin de voir si le mauvais développement du *Sterigmatocystis* noté au cours de ces expériences était bien dû à la présence de l'aluminium, de nouvelles séries de cultures ont été faites dans les conditions suivantes :

Choisissant le milieu le plus concentré en sulfate d'aluminium, parmi ceux que nous avons étudiés, celui qui figure dans le tableau III qui contenait 300 milligrammes d'aluminium pour 200 centimètres cubes de solution nutritive, et dans lequel le *Sterigmatocystis* n'a pas été capable de pousser, j'ai calculé sa teneur en SO^4 .

Puis j'ai préparé une série de milieux de cultures semblables à ceux de la troisième série, chaque essai contenant respectivement 10, 25, 50, 100, 200 et 300 milligrammes d'aluminium, sous forme de sulfate d'aluminium, et dans ces milieux j'ai ajouté du sulfate de sodium de façon qu'ils aient tous la même teneur en ions SO^4 .

Dans le milieu de culture contenant 10 milligrammes d'aluminium et 5 gr. 167 de sulfate de sodium de même que dans

TABLEAU V.

ALUMINIUM introduit en milligrammes pour 200 cent. cubes de solution	SULFATE DE SODIUM introduit en grammes par 200 cent. cubes de solution	POIDS DE MATIÈRE SÈCHE en grammes par culture
Témoin sans aluminium et sans sulfate de sodium.		2,65
10	5,167	3,93
25	4,901	3,80
50	4,455	3
100	3,564	0,550
200	1.872	Néant.
300	0	Néant.

celui contenant 25 milligrammes d'aluminium et 4 gr. 901 de SO_4Na_2 j'ai obtenu de magnifiques cultures bien mieux développées que celles servant de témoins qui ne contenaient ni aluminium, ni SO_4Na_2 , les conidies étaient abondantes, le mycélium épais, le rendement en matière sèche bien plus élevé que celui obtenu précédemment dans les témoins et les cultures contenant simplement de petites quantités de sulfate d'aluminium. Cette amélioration des cultures n'a rien d'étonnant, elle est due au soufre qui favorise le développement du *Sterigmatocystis nigra*, comme l'a démontré Silberstein [7].

Les cultures contenant 50 milligrammes d'aluminium et 4 gr. 455 de sulfate de sodium fournissent un bon rendement en matière sèche, mais elles sont moins bien sporulées que les précédentes; le soufre continue à favoriser le bon développement de la culture, mais l'aluminium qui se trouve dans le milieu manifeste d'une façon atténuée son action toxique.

Dans le milieu contenant 100 milligrammes d'aluminium malgré la présence favorisante du soufre la culture est constituée par des îlots disséminés qui restent blancs sans aucune conidie à leur surface. De même que dans la troisième série les milieux contenant 200 et 300 milligrammes d'aluminium ne donnent aucune trace de mycélium.

On peut conclure que c'est bien l'aluminium qui agit sur ces cultures. Son action se fait sentir à partir de 50 milligrammes par milieu de culture (250 milligrammes par litre de solution nutritive). La présence en quantité massive d'ions SO_4 n'est pas la cause du mauvais développement du *Sterigmatocystis*.

cystis puisqu'au contraire dans des solutions nutritives contenant la même quantité d'ions SO_4 la moisissure se développe abondamment.

La courbe dessinée en pointillé dans la figure 1 représente les rendements de cette dernière série de cultures.

2° INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN IONS HYDROGÈNE SUR LE *Sterigmatocystis nigra*.

Le sulfate d'aluminium est un sel très hydrolysable tendant à acidifier le milieu dans lequel il se trouve dissous; on pourrait donc être tenté de rapporter l'action nocive manifestée par les hautes doses de sulfate d'aluminium en partie au moins à l'acidification du milieu de culture. J'ai pu vérifier qu'il n'en était rien.

Pour cela j'ai préparé à nouveau des solutions nutritives contenant les mêmes quantités de sulfate d'aluminium que les milieux de culture du tableau III, le pH respectif de ces différentes solutions a été déterminé électrométriquement.

Les mesures ont été effectuées à 20° avec une électrode à hydrogène en utilisant comme électrode de référence une électrode à calomel avec solution saturée en KCl.

Le milieu témoin se trouve à pH 2,68 et le milieu contenant le plus d'aluminium se trouve à pH 2.

TABLEAU VI.

ALUMINIUM introduit en milligrammes	MILLIVOLTS	pH
Témoin 0	405	2,68
40	391	2,44
25	381	2,27
10	372	2,11
100	371	2,09
300	365	2

Utilisant alors la solution nutritive privée d'aluminium (le milieu témoin qui se trouve à pH 2,68) je l'ai acidifiée avec de l'acide sulfurique de façon à obtenir une série de milieux dont les pH respectifs se trouvent ajustés aux mêmes valeurs que

ceux de différents milieux aluminés. Pour ajuster ainsi ces solutions on introduit des doses d'acide sulfurique titré calculées par la méthode proposée par M. Machebœuf [8].

On prélève 20 cent. cubes de la solution nutritive qui se trouve à pH 2,68, on ajoute au moyen d'une microburette des

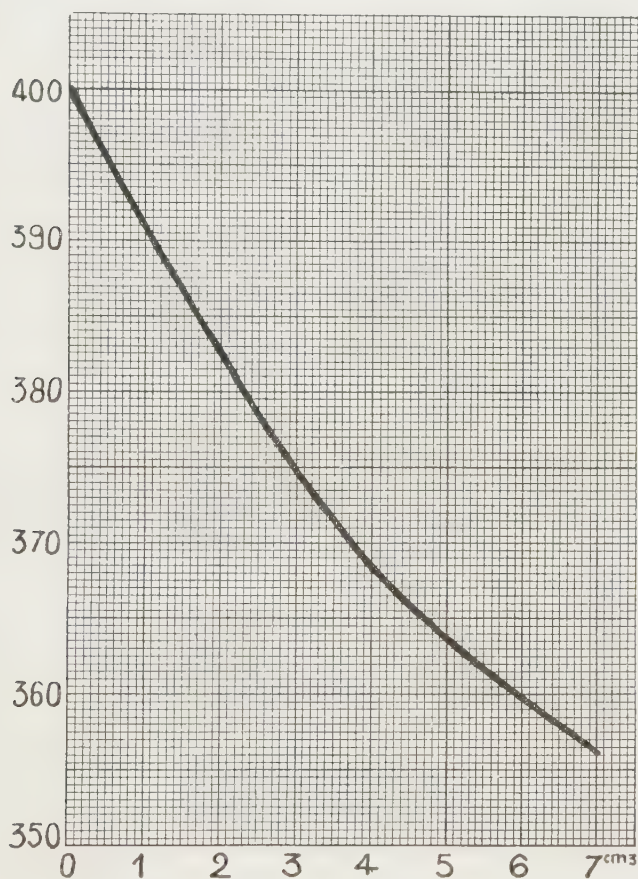


FIG. 2. — Courbe de titration du milieu de culture. Variation du pH en fonction des volumes d'acide sulfurique N/10 ajoutés au milieu.

doses croissantes de SO^4H^2 N/10, puis on trace la courbe des variations du pH en fonction des volumes d'acide ajoutés. Portant en abscisses les volumes de SO^4H^2 titré qui ont été introduits et en ordonnées les forces électromotrices correspon-

dantes, on obtient une courbe qui permet de connaître la quantité d'acide qu'il faut introduire pour ajuster la concentration des ions hydrogène à un point quelconque désiré.

TABLEAU VII.

ACIDE SULFURIQUE N/10 en centimètres cubes	MILLIVOLTS	pH CORRESPONDANT
0	400	2,60
0,40	396	2,53
1,425	387	2,38
1,975	383	2,31
2,575	378	2,22
3,31	372,5	2,13
4,01	368,5	2,06
5,00	363,5	1,97
6,98	356	1,84

Connaissant par ce moyen la quantité d'acide qu'il est nécessaire d'introduire dans 20 cent. cubes de solution pour obtenir le pH désiré il est facile de calculer la quantité qu'il faudra ajouter au milieu de culture total.

Afin d'obtenir finalement des milieux de culture ayant tous un volume de 200 cent. cubes comme d'habitude et pour ne pas changer la concentration en sels du milieu, au lieu de dissoudre les sels dans 200 cent. cubes d'eau distillée, je les ai dissous dans 160 cent. cubes seulement, laissant ainsi 40 cent. cubes de marge que viendront compléter l'acide sulfurique titré et de l'eau distillée en quantités convenables.

TABLEAU VIII.

ACIDE SULFURIQUE N/10 ajouté par milieu de culture en centimètres cubes	EAU DISTILLÉE pour compléter en centimètres cubes	pH OBTENU
7,6	32,4	2,44
17,6	22,4	2,27
27,2	12,8	2,11
28,65	11,35	2,09
36,55	3,45	2,00

Les milieux aluminés d'une part, et les milieux sans aluminium à des pH identiques (acidifiés par l'acide sulfurique) ont

été ensemencés en même temps et placés dans les mêmes conditions :

Voici les résultats obtenus :

TABLEAU IX.

pH DU MILIEU	POIDS DE MATIÈRE SÈCHE en grammes	
	Milieu contenant le sulfate d'alumine	Milieu ne contenant pas d'aluminium
Témoin pH 2,68	2,450	2,500
2,44	2,382	2,650
2,27	2,115	2,421
2,11	1,535	2,600
2,09	0,875	2,555
2	Néant.	2,610

Les cultures qui se sont développées sur les milieux contenant de l'aluminium ont eu l'évolution déjà décrite tableau III, elles manifestent les mêmes variations que dans les essais précédents.

Les milieux dont la concentration en ions hydrogène avait été modifiée par l'introduction d'acide sulfurique et qui avaient respectivement les mêmes pH que les milieux contenant de l'aluminium ont fourni des cultures dont le développement était totalement différent.

Partout (même pour pH 2) le mycélium est abondant et bien développé, les poids de matière sèche sont pour tous les milieux sensiblement les mêmes. Toutes les cultures ont sporulé, mais, si pour les milieux qui se trouvaient au pH 2,44 et au pH 2,27 l'apparition des conidies s'observe normalement au bout du deuxième jour, pour ceux qui se trouvaient à un pH plus bas, pH 2,11 et pH 2,09, il se produit un retard de la sporulation et les conidies sont moins abondantes. Le milieu, qui se trouvait au pH 2, était nettement moins bien sporulé et la culture présentait un retard plus important.

Le changement d'acidité du milieu lorsqu'il est provoqué par l'introduction d'acide sulfurique libre amène une légère modification de la culture qui avait d'ailleurs déjà été signalée par Kiesel [9] dans une étude sur l'action des acides « sur la culture

de l'*Aspergillus niger* ». Dans le cas présent cette modification n'est pas comparable avec le changement radical que l'on observe lorsque l'acidification du milieu est provoquée par l'introduction du sulfate d'aluminium. Pour la même concentration en ions hydrogène, par exemple pH 2, la culture dans laquelle se trouve le sulfate d'aluminium est incapable de fournir même une trace de mycélium alors que celle qui se trouve au même pH mais qui ne contient que de l'acide sulfurique présente un développement presque normal.

Conclusions.

L'aluminium ne paraît pas être un élément indispensable à la vie du *Sterigmatocystis nigra*, puisque des cultures faites sur des milieux privés d'aluminium ont eu un développement normal; cependant, certains métaux tels que le manganèse sont indispensables à la vie du *Sterigmatocystis nigra*, à l'état de traces infimes. Si l'aluminium a une activité catalytique, les méthodes actuelles capables de le déceler sûrement sont insuffisantes pour une telle détermination.

La présence d'aluminium dans le milieu de culture à des doses comprises entre 0 milligr. 005 et 200 milligrammes par litre de solution nutritive n'exerce aucune action sur le développement du *Sterigmatocystis nigra*. Même à très petites doses, il ne favorise pas son développement mais il ne l'entrave en aucune manière.

Introduit dans les milieux de culture à des doses plus élevées, il devient nocif, et pour une concentration de 350 milligrammes par litre de solution nutritive il empêche nettement le développement de la culture. On constate d'abord un retard de l'apparition des conidies, puis la dose d'aluminium étant plus élevée il ne se forme plus du tout de conidies quoique le mycélium se développe encore bien et fournisse encore des poids de matière sèche élevés. C'est seulement pour de très fortes doses, 500 milligrammes par litre de solution, que le mycélium ne se forme plus.

J'ai vérifié que cette action nocive était bien due à l'ion Al, qu'elle n'était pas provoquée par l'introduction massive d'ions

SO⁴ dans le milieu de culture; puis, par une étude des différents pH des milieux, j'ai constaté que ce n'était pas le changement de concentration en ions hydrogène provoqué par l'introduction du sulfate d'aluminium dans la solution qui était la cause du mauvais développement du *Sterigmatocystis nigra*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BERTRAND (G.) et Georgette LÉVY. La teneur des plantes, notamment des plantes alimentaires, en aluminium. *C. R. Acad. Sc.*, **192**, 1931, p. 525.
- [2] BERTRAND (G.) et Georgette LÉVY. Sur la teneur des plantes en aluminium. *Ces Annales*, **47**, 1931, p. 680; *Soc. chim. de France*, 1932, 41-8, 1417.
- [3] RAULIN. Études chimiques sur la végétation. *Thèse Sc.*, Paris, 1870.
- [4] BERTRAND (G.). Sur l'extraordinaire sensibilité de l'*Aspergillus niger* vis-à-vis du manganèse. *Bull. Soc. Chim. de France*, **11**, 1932, 4^e série, p. 403.
- [5] Georgette LÉVY. La présence, la répartition et le rôle de l'aluminium chez les végétaux. *Thèse Sciences*, Paris, 1931, p. 40.
- [6] HÉBERT. Toxicité des sels de Cr, d'Al, de Mg, leur action sur les diverses fermentations. Comparaison avec les propriétés analogues des terres rares. *Bull. Soc. Chim.*, **1**, 1907, p. 1026.
- [7] SILBERSTEIN (L.). Contribution à l'étude du soufre dans le sol et chez les végétaux. *Thèse Sciences*, Paris, 1928.
- [8] MACHEBOEUF (M.). Recherches sur les lipides, les stérols et les protéides du sérum et du plasma sanguin. *Thèse Sciences*, Paris, 1928.
- [9] KIESEL (A.-R.). Recherches sur l'action de divers acides et sels acides sur le développement de l'*Aspergillus niger*. *Ces Annales*, **27**, 1913, p. 391 et 486.

(Institut Pasteur. Laboratoire de M. le Professeur G. Bertrand).

PEUT-ON COMPTER L'OR PARMİ LES ÉLÉMENTS DE LA MATIÈRE VIVANTE

par M. GABRIEL BERTRAND.

D'après une note préliminaire, parue en 1897, Liversidge a reconnu chimiquement l'existence de l'or dans un échantillon de varech, malheureusement très vieux et d'origine indéterminée, et dans des coquilles d'huîtres [1]. En 1919, Cornec a trouvé aussi, en se servant de la méthode spectrographique [2], des traces d'or dans une cendre de plantes marines. D'autre part, il a été démontré que de petites quantités d'or, très probablement à l'état de suspension colloïdale, sont présentes dans les eaux de la mer [3]; il peut donc se trouver des traces du métal précieux à la surface des algues et des coquilles ou dans la vase qui souille ces matériaux d'étude. Comme les précautions nécessaires pour opérer sur des tissus vivants tout à fait propres n'ont probablement pas été prises au cours des expériences de Liversidge et de Cornec, les résultats de ces expérimentateurs ne suffisent pas à démontrer que de l'or existe à l'état normal dans les organismes. Il est d'ailleurs à remarquer que Liversidge n'a fait connaître ses observations qu'à titre provisoire; il se proposait de les vérifier, mais n'a rien publié depuis à leur sujet.

La question en était à ce point lorsque R. Berg publia, en 1928, une série d'expériences établissant, selon lui, la présence de l'or dans le règne végétal et dans le règne animal [4].

Au cours de recherches sur la manière dont le plomb se fixe dans les tissus, cet expérimentateur avait observé que le précipité obtenu en liqueur acide par l'hydrogène sulfuré, précipité formé surtout de sulfure de cuivre, ne se dissolvait pas entièrement, après grillage, dans l'acide chlorhydrique : il restait toujours une minime quantité de poudre noire qu'il considéra comme du charbon très divisé jusqu'au jour où V. Klopfer lui communiqua avoir rencontré de l'or dans des flocons d'avoine.

Il reprit alors l'examen d'un certain nombre de précipités de sulfures qu'il avait conservés de ses recherches antérieures et il reconnut immédiatement, rapporte-t-il, que la poudre noire n'était pas du charbon, mais de l'or. De nouvelles recherches lui permirent de trouver et même de doser l'or dans plusieurs préparations de flocons d'avoine (de 0 milligr. 4 à 2 milligrammes par kilogramme) dans des jus de raisin et de pomme (environ 0 milligr. 1 par kilogramme), du pain de seigle (1 milligramme par kilogramme), des noisettes (1 milligramme par kilogramme) ainsi que dans le sang humain (jusqu'à 0 milligr. 3 par kilogramme, le foie de bœuf (0 milligr. 2 par kilogramme) et, enfin, dans le cerveau du même animal. Ce dernier organe s'est montré particulièrement riche puisque 100 grammes de cerveau desséché avaient fourni 1 milligr. 4 de métal, soit une teneur de 14 milligrammes de métal précieux par kilogramme de matière cérébrale sèche.

Depuis plus d'une trentaine d'années, j'ai eu l'occasion, seul ou avec quelques-uns de mes collaborateurs, d'analyser un très grand nombre d'organismes ou de parties d'organismes végétaux ou animaux. Dans bien des cas où l'opération comportait au début, comme dans les expériences de Berg, un traitement des cendres par l'acide chlorhydrique concentré dans une capsule de platine, j'ai trouvé une quantité facilement reconnaissable du métal de cette capsule dans le précipité des sulfures métalliques [5], mais, jusqu'ici, je n'y ai pas encore reconnu la présence de l'or. Aussi, ai-je tenu à répéter soigneusement l'analyse chimique élémentaire de la cervelle de bœuf, en suivant, autant que possible, la méthode de Berg.

Une cervelle entière, du poids de 340 grammes, a été découpée et mise à sécher à l'étuve à $+ 100^{\circ}$ dans une cuvette rectangulaire de porcelaine, à couverte dure et préalablement nettoyée à l'eau régale. La matière sèche, pesant 78 gr. 5, a été placée dans une capsule de platine de 300 cent. cubes de capacité et chauffée progressivement dans un four à moufle réservé à cet usage, n'ayant jamais servi, par conséquent, à des coupellations. Lorsque la carbonisation, réalisée au rouge naissant, a été complète, on a laissé refroidir, puis on a épuisé la masse charbonneuse (13 grammes), en 4 ou 5 fois, par 200 à 250 cent. cubes d'eau bouillante. La solution filtrée a été mise momen-

tanément de côté tandis que la portion indissoute a été séchée puis calcinée, avec le filtre, au four à moufle. L'incinération, conduite au rouge sombre, a exigé plusieurs heures et a laissé 1 gramme environ de cendres, en partie fondues, englobant à peine quelques centigrammes de charbon. Après refroidissement, la solution des cendres solubles a été transvasée dans la capsule de platine et l'on a évaporé à sec. On a obtenu ainsi 5 gr. 3 de cendres totales que l'on a dissoutes dans quelques centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur, redistillé au laboratoire, et l'on a chauffé au bain-marie, pour insolubiliser la silice. Le résidu est resté sirupeux malgré cinq heures de chauffage. On l'a repris par l'eau acidulée d'acide chlorhydrique dans laquelle il s'est facilement dissous, à l'exception d'un faible résidu floconneux, contenant la silice et le charbon. Ces flocons ont été recueillis sur un filtre, lavés et portés au moufle. Il est resté quelques milligrammes de résidu dont la teinte grisâtre montrait qu'il n'y avait pas exclusivement de la silice. Pour simplifier la recherche, on l'a traité au bain-marie par II gouttes d'acide chlorhydrique et I goutte d'acide nitrique, on a ajouté un peu d'eau, filtré, et réuni le liquide à la solution principale des cendres. Le volume de cette solution était alors d'environ 60 centimètres cubes; on a saturé d'hydrogène sulfuré (5), d'abord à chaud, puis à froid, et, le lendemain, on a recueilli les sulfures. Ceux-ci, bien lavés avec une solution d'hydrogène sulfuré, ont été séchés et brûlés avec leur filtre, dans une capsule de porcelaine. Le résidu noir a été traité au bain-marie, par un peu d'acide chlorhydrique dans lequel il ne s'est dissous qu'en partie : il est resté un peu de poudre noire, insoluble aussi, après lavage à l'eau et dessiccation, dans l'acide azotique pur, mais presque immédiatement soluble, au contraire, dans le mélange des deux acides. La solution résultante a été évaporée à sec. Il est resté un faible enduit de couleur aune qui, d'après Berg, aurait dû être du chlorure d'or. On l'a chauffé encore une fois à sec avec II gouttes d'acide chlorhydrique, puis redissous dans 0 c. c. 05 d'eau et additionné d'une gouttelette de solution concentrée de sulfate ferreux dans l'acide chlorhydrique au vingtième : il n'y a pas eu la moindre coloration bleue. et, cependant, un 1/200 de milligramme d'or aurait suffi pour donner cette réaction caractéristique. La poudre

noire dissoute par l'eau régale n'était donc pas formée par de l'or. J'ai vérifié qu'elle était constituée par du platine en opérant de la manière suivante : la petite solution du chlorure mélangé de sulfate ferreux a été diluée dans un peu d'eau, additionnée de quelques milligrammes de sulfate de cuivre, acidulée d'HCl et saturée par l'hydrogène sulfuré. Le précipité de sulfures a été traité comme il a été décrit plus haut, mais, au lieu d'ajouter finalement à la solution de chlorure régénéré une gouttelette de sulfate ferreux, je l'ai additionnée d'environ 1 milligramme de chlorhydrate d'ammoniac et fait évaporer lentement : j'ai obtenu ainsi des cristaux jaunes de chloroplatinate d'ammoniac en octaèdres parfaitement définis.

Une deuxième expérience a été effectuée sur une cervelle pesant 377 grammes à l'état frais et 89 grammes à l'état sec, mais en produisant et traitant les cendres dans une capsule de silice fondue. Cette expérience a fourni une quantité de silice parfaitement blanche, du poids de 10 milligrammes, manifestement plus grande que dans l'expérience précédente, et un précipité de sulfure de cuivre entièrement soluble dans l'acide chlorhydrique, sans trace d'or, ni de platine. Il n'est donc pas douteux que la poudre noire, séparée du précipité par l'hydrogène sulfuré dans les expériences de Berg, comme dans la mienne décrite plus haut, provenait de l'attaque de la capsule métallique [6].

Berg ne fait aucune allusion dans son mémoire à la présence du platine. Il est vraisemblable qu'il a pris ce métal pour de l'or, mais il est également possible qu'il se soit servi d'une capsule formée, à son insu, d'un alliage des deux métaux, et qu'il ait alors reconnu l'or sans se préoccuper du platine.

Je me suis assuré, à l'occasion des expériences dont je viens de faire connaître les résultats, qu'une minime quantité d'or contenue dans la cervelle ne saurait échapper à l'analyse. J'ai ajouté un dixième de milligramme d'or, dissous à l'état de chlorure dans 1 cent. cube d'eau, à une cervelle de bœuf, préalablement divisée, et pesant 397 grammes. Après dessiccation, la masse, réduite au poids de 87 grammes, a été traitée comme dans la deuxième expérience, c'est-à-dire en utilisant une capsule de silice fondue pour la destruction de la matière organique. Contrairement à mon attente, je n'ai pas trouvé d'or

dans le sulfure de cuivre, mais le métal précieux n'était pas perdu pour cela. Il se trouvait en entier dans la silice qui, au lieu d'être blanche, était manifestement colorée en rose violacé. En traitant cette silice [7] par quelques gouttes d'eau régale, puis un peu d'eau, filtrant la solution et l'évaporant à sec en présence d'un peu d'acide chlorhydrique, de manière à bien chasser l'acide nitrique, j'ai obtenu un résidu dont la solution dans 0 c. c. 1 d'eau était nettement colorée en jaune et donnait instantanément avec le sulfate ferreux une coloration bleue intense, semblable à celle fournie par 1/10 de milligramme d'or dissous dans le même volume d'eau.

Cette expérience a été recommencée en ajoutant seulement 1/100 de milligramme d'or, aussi à l'état de chlorure dissous dans 1 cent. cube d'eau, à une demi-cervelle de bœuf du poids de 198 grammes.

Cette fois encore, le métal précieux a été retrouvé dans la silice. Il y avait une dizaine de milligrammes de celle-ci; sans l'expérience précédente, il n'eût guère été possible d'en retenir la très faible coloration; par traitement à l'eau régale et reprise du chlorure formé dans une petite capsule en porcelaine avec 0 c. c. 25 d'eau, il a été obtenu une solution donnant, avec le réactif ferreux, une coloration bleue presque immédiate et dont l'intensité rappelait celle donnée par 1/100 de milligramme d'or ajouté directement à l'état de chlorure à 1/4 de cent. cube d'eau.

En résumé, l'existence de l'or parmi les éléments de la matière vivante, végétale ou animale, n'a pas encore été démontrée.

BIBLIOGRAPHIE

[1] *Journ. Chem. Soc. Trans.*, **71**, 1897, p. 298.

[2] *C. R.*, **168**, 1919, p. 513.

[3] Ces quantités, variables suivant les régions et les courants, seraient, en moyenne, de l'ordre de grandeur de 50 milligrammes par mètre cube d'eau de mer; mais, dans certains cas, elles se réduiraient à quelques milligrammes et pourraient même devenir nulles. E. SONSTADT. *Chem. News*, **26**, 1872, 159; A. LIVERSIDGE. *Proc. Roy. Soc. N. S. Wales*, **29**, 1895, p. 335; P. DE WILDE, *Arch. des Sc. Phys. et Natur.*, Genève, **19**, 1905, p. 559; etc.

[4] *Biochem. Zeits.*, **198**, 1928, p. 424.

- [5] Voir par exemple : Gab. BERTRAND et V. CIUREA, *C. R.*, 192, 1931, p. 780 et p. 990.
- [6] Filtré à travers du coton à sa sortie du flacon laveur.
- [7] L'attaque du platine ne varie pas seulement avec la température et la durée du chauffage, mais aussi avec la nature de la substance incinérée; la présence des composés du phosphore agit d'une manière particulièrement marquée, le fait est bien connu de ceux qui effectuent des dosages d'acide phosphorique à l'état de pyrophosphate de magnésium. La haute teneur de la cervelle en lécithine explique, sans doute, une plus grande attaque du platine par l'incinération de cette substance que par celle des autres matières organiques.

Le Gérant : G. MASSON.

